

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KAREN PROKOSKI

SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE 25-HIDROXICOLECALCIFEROL (25-OHD<sub>3</sub>) EM  
DIFERENTES FASES DE CRIAÇÃO NO CRESCIMENTO ÓSSEO E MUSCULAR  
DE FRANGOS DE CORTE



PALOTINA

2019

KAREN PROKOSKI

SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE 25-HIDROXICOLECALCIFEROL (25-0HD<sub>3</sub>) EM  
DIFERENTES FASES DE CRIAÇÃO NO CRESCIMENTO ÓSSEO E MUSCULAR  
DE FRANGOS DE CORTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Produção Animal, linha de pesquisa em Nutrição e Produção Avícola, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dra. Jovanir Inês Müller  
Fernandes

PALOTINA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P964 Prokoski, Karen  
Suplementação dietética de 25-hidroxicolecalciferol (25-OH D<sub>3</sub>) em diferentes fases de criação no crescimento ósseo e muscular de frangos de cortes / Karen Prokoski – Palotina, 2019. 98f.

Orientadora: Jovanir Inês Müller Fernandes  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

1. Programas vitamínicos. 2. Rendimento de peito. 3. Via mTOR. 4. Miopatia. I. Fernandes, Jovanir Inês Müller. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.



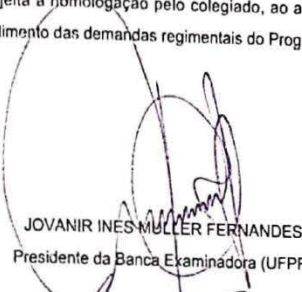
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR PALOTINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL -  
40001016077P6

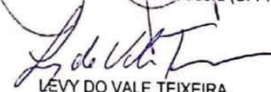
### TERMO DE APROVAÇÃO


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **KAREN PROKOSKI** intitulada: **Suplementação dietética de 25-hidroxicolecalciferol (25-OHD3) em diferentes fases de criação no crescimento ósseo e muscular de frangos de corte**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Palotina, 19 de Março de 2019.

  
JOVANIR INES MULLER FERNANDES  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
LEVY DO VALE TEIXEIRA  
Avaliador Externo (UFLA)

  
VINICIUS CUNHA BARCELLOS  
Avaliador Interno (UFPR)

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

Karen Prokoski é formada em medicina veterinária na Universidade Federal do Paraná – UFPR, setor Palotina, no ano 2014, onde fez parte do grupo de pesquisa de avicultura.

Realizou seu estágio curricular na empresa Pluma Agroavícola, onde atuou como trainee, supervisora de qualidade da fábrica de rações e farinhas, e desde fevereiro de 2017 como nutricionista animal.

Ingressou no mestrado em Ciência Animal, no programa de pós-graduação da Universidade Federal do Paraná – Palotina, em fevereiro de 2017.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por permitir que eu trilhe mais esse caminho, junto de pessoas maravilhosas, adquirindo conhecimento na área que atuo.

À minha orientadora professora Jovanir, Jô, por todo conhecimento compartilhado, pela ajuda e compreensão por eu fazer mestrado trabalhando. Espero um dia ser fonte de inspiração e uma referência profissional como você é.

Agradeço a minha mãe por sempre me apoiar e não me deixar desanimar em nenhum momento.

Ao meu marido Jeferson, por compreender que os finais de semana eram para a dissertação.

Agradeço as minhas amigas, Maria e Jana, por me aconselharem e auxiliarem nessa etapa.

Agradeço a minha gerente e amiga Elisangela Gottardo por me permitir a oportunidade de realizar o mestrado, e com isso agradecer a empresa Bello Alimentos LTDA.

À equipe do laboratório de experimentação avícola (LEA), por toda ajuda nas análises, sem o comprometimento e dedicação de vocês eu não teria conseguido.

Agradeço ao Sérgio Rodrigo Fernandes, pós-doutorando do PPGCA, pelo auxílio na estatística e esclarecer as dúvidas dos resultados.

Agradeço ao coordenador do mestrado, professor Luciano Bersot, por todo o auxílio durante o período.

À empresa DSM por ter possibilitado a realização desta pesquisa dando todo o suporte necessário para a realização das análises, em especial a Letícia Cardoso Bittencourt.

E por fim, ao programa de pós-graduação em Ciência Animal – PPGCA da Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina, por me permitir novamente retornar a Universidade que me formei e que tanto me orgulho.

*"Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta."*  
Carl Sagan

## RESUMO

O experimento teve por objetivo avaliar a inclusão de 25-hidroxicolecalciferol (25-OHD3) em dietas iniciais, de crescimento ou abate suplementadas com vitamina D<sub>3</sub> sobre o desempenho produtivo, bem-estar, retenção mineral, características de carcaça, parâmetros ósseos e sanguíneos, qualidade da carne, miopatias e expressão gênica do músculo do peito de frangos de corte de 1 a 46 dias de idade. Para isso, foram utilizados 1584 pintos de corte Ross®, machos. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos de 9 repetições com 44 aves cada (12,5 aves/m<sup>2</sup>). Os níveis de suplementação de vitamina D foram fornecidos em concentrações iguais (3,000 UI/kg de ração) em todas as dietas. A dieta controle (DC) continha 3,000 UI D<sub>3</sub> por kg de ração, oferecida no período de 1 a 46 dias, enquanto as dietas experimentais continham 3000 UI D<sub>3</sub> + 2760 UI de 25-OHD3 por kg de ração, oferecidas em três programas de alimentação: 1 a 21, 1 a 35 e 1 a 46 dias. A inclusão de 25-OHD3 nas rações para frangos de corte em diferentes períodos de criação não alterou ( $p > 0,05$ ) os parâmetros de desempenho produtivo, *gaît score*, rendimento de carcaça e qualidade de carne. Para as medidas ósseas, houve correlação positiva ( $r = 0,291$ ) entre a densitometria óssea e os níveis séricos de 25-OHD3 quando suplementado durante todo o período de criação. Foi observado efeito quadrático ( $p < 0,05$ ) crescente da inclusão de 25-OHD3 a partir da suplementação de 1 a 21 dias sobre os níveis séricos de 25-OHD3, expressão gênica da proteína mTOR e teor de proteína no peito. Enquanto o rendimento do peito aumentou linearmente ( $p < 0,05$ ) de acordo com o período de suplementação. As aves suplementadas com 25-OHD3 por 46 dias apresentaram concentrações circulantes de 25-OHD3 significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) em comparação com a dieta controle e com as suplementações de 21 e 35 dias. Os níveis séricos 25-OHD3 avaliados possuem correlação positiva ( $r = 0,58$ ) com a expressão da via mTOR, que por sua vez, resulta em estimulação da síntese proteica no peito das aves. A avaliação histológica do peito mostrou diminuição ( $p < 0,05$ ) da incorporação de colágeno e gordura nas fibras musculares de acordo com o período de suplementação de 25-OHD3. O programa vitamínico proposto com a suplementação de 25-OHD3 associado a vitamina D<sub>3</sub> durante toda a vida produtiva das aves contribuiu positivamente para o aumento dos níveis séricos de vitamina D e expressão da via mTOR, sendo uma estratégia interessante para aumentar o rendimento de peito, apesar de não resultar em benefícios sobre o desempenho produtivo, a estrutura óssea e a qualidade da carne.

Palavras-chave: Programas vitamínicos. Rendimento de peito. Via mTOR. Miopatia.



## ABSTRACT

The objective of this experiment was to evaluate the inclusion of 25-hydroxycholecalciferol (25-OHD3) in diets, supplemented with vitamin D3, on yield, well-being, mineral retention, carcass characteristics, bone parameters and blood pressure, meat quality, myopathies and gene expression of the breast muscle of broiler chickens from 1 to 46 days of age. For this, 1584 Ross® male broilers were used. The experimental design was completely randomized with 4 treatments of 9 replicates with 44 birds each (12.5 birds / m<sup>2</sup>). Vitamin D supplementation levels were given in equal concentrations (3,000 IU / kg of feed) in all diets. The control diet (DC) contained 3,000 IU D3 per kg of feed, offered in the period from 1 to 46 days, while the experimental diets contained 3000 IU D3 + 2760 IU of 25-OHD3 per kg of feed, offered in three programs of feed: 1 to 21, 1 to 35 and 1 to 46 days. The inclusion of 25-OHD3 in the diets for broiler chickens in different breeding seasons did not change ( $p > 0.05$ ) the parameters of productive performance, gait score, carcass yield and meat quality. For bone measurements, there was a positive correlation ( $r = 0.291$ ) between bone densitometry and serum levels of 25-OHD3 when supplemented throughout the breeding period. Increasing quadratic ( $p < 0.05$ ) effect of 25-OHD3 inclusion from 1 to 21 day supplementation on serum levels of 25-OHD3, gene expression of mTOR protein, and protein content in chest. While the breast yield increased linearly ( $p < 0.05$ ) according to the period of supplementation. The birds supplemented with 25-OHD3 for 46 days had significantly higher circulating concentrations of 25-OHD3 ( $p < 0.05$ ) compared to the control diet and supplements of 21 and 35 days. The serum 25-OHD3 levels were positively correlated ( $r = 0.58$ ) with expression of the mTOR pathway, which in turn resulted in stimulation of protein synthesis in the breast of the birds. Histological evaluation of the chest showed a decrease ( $p < 0.05$ ) in the incorporation of collagen and fat in muscle fibers according to the 25-OHD3 supplementation period. The vitamin program proposed with vitamin D3 supplementation of 25-OHD3 during the whole productive life of the birds contributed positively to the increase of serum vitamin D levels and expression of the mTOR pathway, being an interesting strategy to increase the yield of breast, although it does not result in benefits on the productive performance, the bony structure and the quality of the meat.

Keywords: Vitamin programs. Breastfeeding. Via mTOR. Myopathy.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1 – EPÍFISE PROXIMAL, DIÁFISE E EPÍFISE DISTAL .....	21
FIGURA 2 – VIA mTOR.....	27
FIGURA 3 – FORMAÇÃO DA VITAMINA D E SEUS METABÓLITOS.....	31

### CAPÍTULO 1:

FIGURA 1 – RADIOGRAFIA PARA MEDIÇÃO DA DENSITOMETRIA ÓSSEA.....	45
FIGURA 2 – PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE DA RELAÇÃO CARTILAGEM:OSSO NA EPÍFISE DA TÍBIA.....	47
FIGURA 3 – CORRELAÇÃO ENTRE A DENSITOMETRIA ÓSSEA E O NÍVEL SÉRICO DE 25-OHD3 AOS 46 DIAS.....	51

### CAPÍTULO 2:

FIGURA 1 - RENDIMENTO DE PEITO (FILÉ + SASSAMI) DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D <sub>3</sub> E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE.....	73
FIGURA 2 - NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D <sub>3</sub> E COM INCLUSÃO DE 25- OHD3 EM DIETAS INICIAS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE.....	74
FIGURA 3 - NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D DE FRANGOS DE CORTE DE ACORDO COM A INGESTÃO DE VITAMINA D <sub>3</sub> E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE.....	75
FIGURA 4 - EXPRESSÃO DO MARCADOR DE INICIALIZAÇÃO DE SÍNTESE PROTEICA mTOR NO PEITO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D <sub>3</sub> E COM INCLUSÃO DE 25- OHD3 EM DIETAS INICIAS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE.....	75
FIGURA 5- CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DO MARCADOR DE INICIALIZAÇÃO DE SÍNTESE PROTEICA mTOR NO PEITO DE	

FRANGOS DE CORTE E O NÍVEL SÉRICO DE 25-OHD3 AOS 46 DIAS.....	76
FIGURA 6 - DEPOSIÇÃO DE PROTEÍNA NO PEITO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D <sub>3</sub> E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAIS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE.....	76
FIGURA 7 - COMPOSIÇÃO DO TECIDO MUSCULAR DO PEITO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D <sub>3</sub> E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAIS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE.....	79

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1:

TABELA 1 - TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS .....	41
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO E NÍVEIS NUTRICIONAIS DAS RAÇÕES NAS FASES INICIAL (1 A 21 DIAS), CRESCIMENTO (22 A 35 DIAS) E ABATE (36 A 46 DIAS) DE FRANGOS DE CORTE.....	42
TABELA 3 - RESULTADOS BROMATOLÓGICO DAS RAÇÕES EXPERIMENTAIS .....	43
TABELA 4 - RECUPERAÇÃO DO METABÓLITO 25-HIDROXICOLECALCIFEROL ADICIONADO NAS DIETAS EXPERIMENTAIS. ....	43
TABELA 5 - DESEMPENHO PRODUTIVO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D3 E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAS NO PERÍODO DE 1 A 21 DIAS DE IDADE....	48
TABELA 6 - DESEMPENHO PRODUTIVO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D3 E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAS E DE CRESCIMENTO NO PERÍODO DE 1 A 35 DIAS DE IDADE.....	48
TABELA 7 - DESEMPENHO PRODUTIVO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D3 E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAS, DE CRESCIMENTO E ABATE NO PERÍODO DE 1 A 45 DIAS DE IDADE.....	49
TABELA 8 - GAIT SCORE (%) DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D3 E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAS, DE CRESCIMENTO OU ABATE NO PERÍODO DE 1 A 45 DIAS DE IDADE.. ....	49
TABELA 9 - RESISTÊNCIA ÓSSEA À QUEBRA E MEDIDAS ÓSSEAS DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D3 E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE.....	50
TABELA 10 - PARÂMETROS DE INTEGRIDADE DO TIBIOTARSO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D3 E COM	

INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE.....	50
---	----

## **CAPÍTULO 2:**

TABELA 1 - TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS .....	64
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO E NÍVEIS NUTRICIONAIS DAS RAÇÕES NAS FASES INICIAL (1 A 21 DIAS), CRESCIMENTO (22 A 35 DIAS) E ABATE (36 A 46 DIAS) DE FRANGOS DE CORTE.....	65
TABELA 3 - RESULTADOS BROMATOLÓGICO DAS RAÇÕES EXPERIMENTAIS .....	66
TABELA 4 - RECUPERAÇÃO DO METABÓLITO 25-HIDROXICOLECALCIFEROL ADICIONADO NAS DIETAS EXPERIMENTAIS. ....	66
TABELA 5 - RENDIMENTO DE CARCAÇA E CORTES COMERCIAIS E DEPOSIÇÃO DE GORDURA ABDOMINAL DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D <sub>3</sub> E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAIS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE.....	72
TABELA 6 - QUALIDADE DA CARNE DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D <sub>3</sub> E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAIS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE.....	77
TABELA 7 - LESÃO DE WOODEN BREAST DE PEITO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D <sub>3</sub> E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAIS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE .....	78
TABELA 8 - COMPOSIÇÃO DO TECIDO MUSCULAR (%) EM FIBRA MUSCULAR FM), COLÁGENO E GORDURA DO PEITO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D <sub>3</sub> E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAIS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE .....	78

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2.REVISÃO DE LITERATURA</b>	19
2.1 CRESCIMENTO E INTEGRIDADE ÓSSEA	19
2.1.1 Tecido ósseo:	19
2.1.2 Fatores que influenciam o desenvolvimento e a resistência óssea:	23
2.1.3 Avaliação da qualidade óssea:	24
2.2 CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO MUSCULAR	25
2.2.1 Miopatias	28
2.2.2 Qualidade e rendimento da carne	29
2.3 SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D	30
2.3.1 Vitamina D e metabólitos relacionados	32
2.3.2 Efeitos da vitamina D <sub>3</sub> e metabólitos sobre a produção de frangos de corte	33
<b>3. OBJETIVOS</b>	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
<b>CAPÍTULO 1: SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE VITAMINA D (25-0HD3) EM DIFERENTES FASES DE CRIAÇÃO SOBRE O DESEMPENHO PRODUTIVO E A QUALIDADE ÓSSEA DE FRANGOS DE CORTE</b>	37
INTRODUÇÃO	39
MATERIAL E MÉTODOS	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
CONCLUSÃO	55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS – CAPÍTULO 1	56
<b>CAPÍTULO 2: SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE VITAMINA D (25-0HD3) EM DIFERENTES FASES DE CRIAÇÃO SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DO MTOR, RENDIMENTO E QUALIDADE DE CARNE E OCORRÊNCIA DE WOODEN BREAST DE FRANGOS DE CORTE</b>	60
INTRODUÇÃO	62
MATERIAL E MÉTODOS	63
RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
CONCLUSÃO	84
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS – CAPÍTULO 2	85
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	90



**5. REFERENCIAS.....92**

## 1. INTRODUÇÃO

A produção brasileira de carne de frango vem aumentando nos últimos anos, afim de atender população com renda familiar crescente e ao aumento na demanda mundial de países com economia emergente como China e Índia (ABPA, 2018)

Os ganhos de produtividade da avicultura brasileira estão associados à coordenação da cadeia avícola, através das tecnologias utilizadas, bem como dos programas de melhoramento genético, sanidade e nutrição diferenciada (VIEITES et al., 2014).

Os programas genéticos são baseados em parâmetros de desempenho e características associadas ao elevado crescimento muscular, eficiência alimentar e melhor rendimento de carne, principalmente peito. Entretanto, esse rápido crescimento não é acompanhado do suporte esquelético. De certa forma, o tecido ósseo ainda encontra-se imaturo, tendo como consequência o aparecimento de problemas locomotores (ALVES et al., 2013).

As deformidades ósseas são geradas por modificações no processo de crescimento normal e da homeostase no tecido ósseo (PONSO et al., 2012). Geralmente os problemas iniciais são ocasionados pela discondroplasia tibial (DT) e os estruturais, pela deformidade e distorções dos ossos longos, sobretudo no final do crescimento (BARBOSA et al., 2010)

Outra grande preocupação proveniente do rápido crescimento das aves são as miopatias. A criação de frangos de corte para pesos de mercado maiores e curto espaço de tempo, culmina com o crescimento acelerado da musculatura peitoral. Esse resultado proveniente da seleção genética resultou em profundas alterações através da hipertrofia das fibras musculares, promovendo um aumento do diâmetro das fibras, reduzindo o espaço para o tecido conjuntivo e, como consequência, causando aumento na degeneração muscular. Estas alterações morfológicas limitam o aporte sanguíneo, que altera a qualidade da carne (SANDERCOCK et al., 2009).

Além do aspecto prejudicado, também aumentam os problemas associados ao processamento dessa proteína, como falta de tenacidade, fraca coesão relacionadas à imaturidade intramuscular do tecido conjuntivo e capacidade reduzida da carne para reter água durante o processamento e armazenamento, que trazem grandes perdas econômicas devido à condenação de carcaças e a rejeição pelo consumidor (BAILEY et al., 2015).

Desta forma, com o intuito de diminuir perdas e reduzir custos no setor avícola, pesquisadores têm buscado alternativas nutricionais. Dentre elas, encontra-se a vitamina D<sub>3</sub> e seus metabólitos, em virtude de sua importante atividade biológica no organismo. A participação na regulação da homeostase de cálcio (Ca) e fósforo (P) em um mecanismo no qual aumenta a captação intestinal, diminuindo as perdas renais e ainda estimulando a reabsorção óssea, é uma das funções classicamente descritas na literatura associando a vitamina D ao processo de mineralização óssea (McDOWELL; RUSSEL, 1989).

Essa vitamina está envolvida em múltiplos processos biológicos além do metabolismo ósseo. É um potente regulador do sistema imunológico em geral e especificamente das células T. No metabolismo, o 1,25-OH<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> liga-se ao receptor de vitamina D (VDR) presentes no timo e juntos regulam a transcrição de diversos genes, aumentando a produção de Interleucina-4. A presença de VDR em células mononucleares sanguíneas e em células CD4<sup>+</sup> Th sugere a influência da vitamina D no sistema imunológico (CATORNA et al., 2004).

A D<sub>3</sub> não é biologicamente ativa, sendo convertida *in vivo* a forma ativa por duas reações sequenciais de hidroxilação. A primeira hidroxilação acontece no fígado, na posição 25, sendo catalisada pela 25-hidroxilase. O produto da reação, o 25-hidroxicolecalciferol (25-OHD<sub>3</sub>), é a forma predominante no plasma, sendo uma importante forma de armazenamento da vitamina. O 25-OHD<sub>3</sub> é posteriormente hidroxilado na porção 1 por uma 1 $\alpha$ hidroxilase específica. O resultado é a formação de 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25-OH<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>) ou calcitriol (ABREU et al., 2009).

Atualmente há disponível no mercado para uso na alimentação animal os metabólitos formados a partir da vitamina D (D<sub>3</sub>, 25-OHD<sub>3</sub>, 1,25-OH<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub>), cujo objetivo refere-se à disponibilização da vitamina numa forma mais ativa, de modo que ocorra diminuição nos gastos energéticos com metabolização da vitamina, e tendo como consequência o aumento na eficiência no organismo (GARCIA et al., 2013).

Diversos estudos na área da saúde humana apontam a suplementação da Vitamina D associada à melhora nos testes de função muscular, redução de quedas, e impacto na composição e morfologia das fibras musculares. Além disso, sua deficiência pode levar a quadros de sarcopenia (redução da massa muscular), fraqueza muscular e contribui para um aumento do risco de danos musculares e miopatias. Também a atrofia de fibras musculares do tipo II (fibras rápidas, utilizadas

em exercícios de força) (BARTOSZEWSKA et al., 2010; MELLO et al., 2010; SILVA; SCHNEIDER, 2016)

Hutton et al. (2014) mostraram que a suplementação de 25-OHD3 estimula a atividade de células satélites do músculo *pectoralis major* da ave, sendo assim, 25-OHD3 aumenta o rendimento muscular através da hiperplasia da fibra muscular. Vignale et al. (2015) apontaram outra via de atuação da vitamina sobre o crescimento muscular. A 25-OHD3 estimula a síntese protéica através de um aumento nas taxas de iniciação traducional, processo que envolve diversos fatores de iniciação, quinases e fosfatases, cujas atividades são reguladas por fosforilação. Esta ativação ocorre por vias de sinalização dependentes da proteína quinase mTOR (sensível à rapamicina). Trabalhos recentes também mostram que a suplementação com vitamina D altera a composição corporal e a deposição de gordura (BHAT et al., 2014).

Com o aumento do consumo e das exportações, também cresce as exigências dos consumidores, sobretudo em países desenvolvidos. As restrições para o comércio internacional sobre a alimentação, ambiente, sanidade e bem-estar, impostas pelos compradores, elevam os custos de produção e limitam a rentabilidade da produção avícola. Sendo assim, ajustes precisos promovidos através da nutrição são capazes de estabelecer estratégias para uma produção mais eficiente a fim de reduzir os custos e atender as legislações e demandas de mercados consumidores.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CRESCIMENTO E INTEGRIDADE ÓSSEA

#### 2.1.1 Tecido ósseo:

O osso é um tecido multifuncional, metabolicamente muito ativo, constituído de uma população heterogênea de células, em diferentes estágios de diferenciação, que, através de coordenada sequência de eventos, regula a mobilização e a deposição mineral durante a vida do animal (PIZAURO JUNIOR et al., 2017). Dentre as diversas funções desse tecido estão o crescimento, sustentação e proteção da musculatura e órgãos, atuam como alavancas transformando as contrações musculares em movimento e alojamento da medula óssea (LAWRENCE; FOWLER, 1997). Além disso, servem de reservatório de cálcio e fosforo os quais podem ser mobilizados durante distúrbios da homeostase (PIZAURO JÚNIOR, 2002).

O tecido ósseo é constituído de aproximadamente 70% de minerais, principalmente cálcio e fósforo, 22% de proteína e 8% de água (PIZAURO JUNIOR et al., 2017). A matriz óssea pode ser dividida em parte orgânica e inorgânica. O colágeno do tipo I constitui, aproximadamente, cerca de 95% da matriz orgânica, os 5% restantes são compostos de proteoglicanas e várias outras proteínas do tipo não colagenosas (PIZAURO JUNIOR et al., 2017). A matriz inorgânica é formada por minerais como carbonato de cálcio e fosfato de magnésio, predominantemente encontra-se o fosfato e o cálcio, na forma de cristais de hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  durante o processo de mineralização e confere propriedades de rigidez e resistência à compressão (FIELD, 2000; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). De um modo geral, apresentam semelhante constituição nas diferentes espécies com particulares idades no tamanho e forma (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Neste tecido estão presentes quatro tipos de células: os osteoblastos, osteócitos e osteoprogenitoras, responsáveis pela formação e mineralização; e os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção. A produção dessas células ocorre em dois sistemas fisiológicos, o hematopoiético e estroma fibroblástico. Os osteoclastos são provenientes do sistema hematopoiético, enquanto os osteoblastos, os osteócitos, os condoblastos, células mesenquimais progenitoras, e os condrócitos, células responsáveis pela produção e manutenção da matriz cartilaginosa são originadas do estroma fibroblástico (PIZAURO JUNIOR et al., 2017).

A formação do tecido ósseo pode ocorrer ou por um processo indireto chamado de endocondral ou por um processo direto chamado de intramembranosa (LONG; ORNITZ, 2013; PIZAUIRO JÚNIOR et al., 2017). O processo de ossificação intramembranosa é responsável pelo crescimento dos ossos chatos pela adição de tecido ósseo na superfície de estruturas pré-existentes, e o processo de ossificação endocondral, é responsável pelo crescimento dos ossos longos, ocorrendo o crescimento do osso a partir do tecido cartilaginoso, com o tecido ósseo sendo depositado em uma espécie de rede de tecido cartilaginoso pré-calcificado (PIZAUIRO JÚNIOR, 2002).

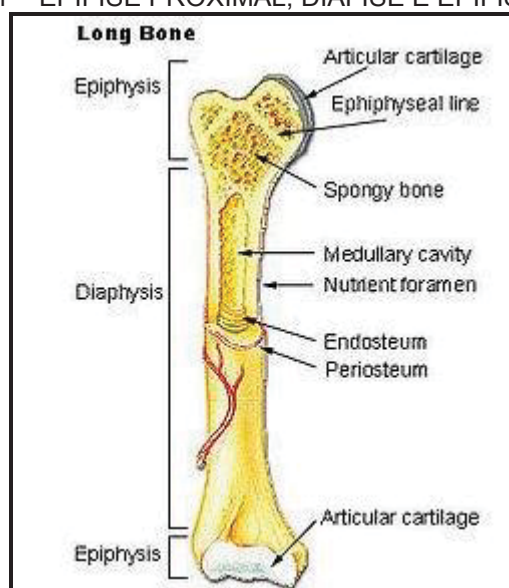
O processo de ossificação intramembranosa ocorre durante o desenvolvimento embrionário e inicia-se pela diferenciação de células mesenquimatosas em osteoblastos que são responsáveis pela síntese de osteóide no mesênquima e pelo aparecimento dos osteócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Em ossos longos, a ossificação intramembranosa é responsável pelo aparecimento do centro primário de ossificação na parte central do osso e vai crescer radialmente, produzindo uma rede de trabéculas ósseas (GUYTON, 1997), esse tipo de ossificação é denominado de osteogênese periosteal ou pericondral.

Em aves e mamíferos, a ossificação endocondral é responsável pelo crescimento longitudinal da maior parte de ossos do esqueleto. Os centros de ossificação secundários, presente nas extremidades dos ossos longos são responsáveis pelo crescimento do tecido ósseo. Esse desenvolvimento ocorre especificamente no disco epifisário através dos condrócitos que se encontram em diferentes estágios de desenvolvimento dependendo da localização no interior do disco de crescimento (PIZAUIRO JÚNIOR et al., 2002).

Os condrócitos são as células responsáveis pela calcificação no disco epifisário o qual possui cartilagem que forma uma estreita faixa de ligação (0,5 a 1 mm) entre a epífise proximal e diáfise (Figura 1) podendo ser dividido em algumas regiões: zona de reserva, zona de proliferação, zona de maturação, zona hipertrófica e zona de calcificação (PIZAUIRO JÚNIOR et al., 2017).



FIGURA 1 – EPÍFISE PROXIMAL, DIÁFISE E EPÍFISE DISTAL



FONTE: BOUNDLESS (2015)

Em cada uma dessas regiões é possível observar o desenvolvimento dos condrócitos, é na zona de maturação que ocorre a síntese e secreção de matriz com participação da fosfatase alcalina. E por fim, na zona de calcificação os condrócitos são degenerados para que ocorra o depósito de fosfato de cálcio no interior das vesículas (PIZAURO JÚNIOR et al., 2002; SANTOS, 2016).

Durante o pico de crescimento dos frangos de corte, os principais eventos fisiológicos da ossificação endocondral podem ocorrer em menos de 24 horas, sendo a proliferação dos condrócitos, calcificação da matriz, invasão vascular, degradação da matriz e formação primária dos ossos. Os condrócitos ativos passam pelos estágios de proliferação, diferenciação e apoptose, antes dos vasos sanguíneos penetrarem nas lacunas remanescentes (MURAKAMI, 2000).

A deposição óssea é continuamente realizada pelos osteoblastos, encontrados na superfície externa dos ossos, bem como em suas cavidades, enquanto que a absorção óssea ocorre pela ação dos osteoclastos havendo equilíbrio entre deposição e absorção, exceto nos animais em crescimento. Os osteoblastos secretam grandes quantidades da enzima fosfatase alcalina no sangue indicando a deposição ativa de fosfato inorgânico na matriz óssea, sendo, portanto, bom indicador de formação óssea (SWENSON; REECE, 1996).

O processo de calcificação do tecido ósseo envolve as vesículas extracelulares, as quais estão relacionadas com o ciclo de vida dos condrócitos e, possivelmente, com o seu processo de apoptose (PIZAURO JÚNIOR et al., 2002).

Inicia-se pela produção e liberação de vesículas extracelulares, ricas em fosfatase alcalina, pelos osteoblastos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Essas vesículas podem se desenvolver em locais de depósito de minerais, e, desta forma, apresentarem-se como mediadoras da deposição mineral, e nos osteoblastos essa estrutura é encontrada na membrana plasmática adjacente à matriz óssea recém-formada. O aumento do produto iônico (cálcio versus fosfato) provoca a precipitação do fosfato de cálcio e a formação de cristais na forma de pequenas agulhas ou bastões. O acúmulo destes cristais rompe as membranas das vesículas e extravasam para o meio extracelular, provocando assim o crescimento dos cristais na forma de hidroxiapatita (PIZAURO JÚNIOR, 2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Além da fosfatase alcalina, existem outras enzimas presente na membrana que são importante para o processo de calcificação, como a ectoenzima fosfodiesterase nucleotídeo pirofosfatase (PC-1) a qual gera o pirofosfato inorgânico (PPi) a partir do sequestro de ATP presente no fluido extracelular da cartilagem, entretanto o PPi atua como inibidor da calcificação (GIJSBERS et al., 2001). A atividade da fosfatase alcalina pode ser controlada pelo produto de sua reação, ou seja, a presença do fósforo inorgânico no fluído extracelular resultante da hidrólise do PPi, são processos que regulam mineralização biológica (PIZAURO JÚNIOR et al., 1987; SANTOS, 2016).

A regulação do desenvolvimento do tecido ósseo, do metabolismo e da homeostase do cálcio é desempenhado pela forma ativa da vitamina D, o 1,25-diidroxicolecalciferol, possuindo papel fundamental na regulação do crescimento e diferenciação celular do tecido ósseo. A mobilização do cálcio do osso para o fluído extracelular ocorre a partir da ação conjunta do composto ativo da vitamina D, e do hormônio da paratireoide. Os osteoblastos são estimulados a produzirem osteocalcina e fosfatase alcalina, aumentando o recrutamento, a diferenciação e a fusão dos precursores em osteoclastos ativos, além disso, aumenta ainda a reabsorção de cálcio e fosfato no osso ainda não mineralizado. Por meio de suas ações no intestino, rins, ossos e glândulas paratiróideanas, o 1,25-diidroxicolecalciferol é fundamental para a homeostase do cálcio e para o desenvolvimento de um esqueleto saudável (BRITO et al., 2010).

### 2.1.2 Fatores que influenciam o desenvolvimento e a resistência óssea:

Desde o início da produção de aves os problemas locomotores têm sido relatados. Vários fatores afetam diretamente o crescimento normal do tecido ósseo e contribuem para as deformidades do esqueleto. Dentre esses fatores destacam-se: fatores endócrinos, genética, sexo, idade, infecções e estresses, presença de patógenos e doenças, bem como a nutrição (COOK, 2000).

Os fatores endógenos são inerentes ao animal, e envolvem os hormônios sistêmicos, principalmente o paratormônio (PTH), calcitriol (1,25-OH<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>), calcitonina, estrogênios, glicocorticóides e retinóis. Dentre os fatores de ação local destacam-se as interleucinas, fatores de crescimento (tais como o IGF-I e II), prostaglandinas (especialmente a PGE<sub>2</sub>), neuropeptídeos e citocininas (PRICE; RUSSEL, 1992).

Os fatores exógenos são os fatores externos que podem ser alterados no período de criação das aves. Com o avanço do melhoramento genético, as anormalidades locomotoras, especialmente as que geram restrição na mobilidade são comumente observadas na metade final do crescimento das aves. O desenvolvimento desproporcional do músculo do peito e a diminuição proporção dos músculos e ossos da perna, criam um desbalanço esquelético biomecânico, provocando disfunções estruturais e comprometendo assim a locomoção normal das aves (BARBOSA et al., 2010).

A fragilidade das pernas dos frangos de corte, foi identificada como decorrente de alterações na placa de crescimento, raquitismo, discondroplasia, degeneração femoral, espondilolistese, desordens do desenvolvimento ósseo, dificuldades ao caminhar e defeitos de angulação do tipo valgus e varus. Essas alterações comprometem o resultado produtivo, é relatada a ocorrência de 3 a 6% de refugos e descartes de aves na linha de abate, devido a problemas de pernas, resultando em perdas econômicas significativa (MENDONÇA, 2000).

Além disso, com a redução do tempo para o abate e o aumento da taxa metabólica do frango moderno, há uma formação óssea com tecidos insuficientemente mineralizados, aumentando a porosidade óssea, permitindo uma alteração conhecida como Síndrome do Osso Negro (Black Bone Syndrome) (WHITEHEAD, 2009).

Esse problema é caracterizado pelo escurecimento da carne adjacente ao osso, isso é devido ao extravasamento de sangue da medula óssea para a carne, ocorrendo principalmente em coxas e sobrecoxas, podendo ser observado na carne

in natura ou após o cozimento (WHITEHEAD, 2009). A síndrome do osso negro é um problema ósseo com implicações na qualidade da carne, alterando principalmente a aparência da mesma devido ao escurecimento causado, gerando recusa do consumidor.

O sexo pode influenciar o crescimento e a resistência óssea devido as diferenças hormonais entre machos e fêmeas. Aves da mesma idade, porém de sexos diferentes apresentaram diferentes diâmetros de diáfise, com as fêmeas demonstrando sempre um valor inferior (RATH et al., 1999).

A nutrição desempenha um papel fundamental para a obtenção de um tecido ósseo de alta qualidade. O crescimento ósseo pode ser afetado pelos níveis de cálcio, fósforo, íons monovalentes, minerais, proteínas, aminoácidos, carbonatos e vitaminas, principalmente a vitamina D<sub>3</sub> (WHITEHEAD, 2009).

O controle da homeostase de cálcio é uma importante força motora na manutenção da resistência óssea, a baixa concentração desse mineral pode aumentar os níveis de reabsorção óssea diminuindo a resistência. A deficiência de Ca em aves não está restrita apenas à alimentação, a má absorção, que podem estar associadas à presença de fatores antinutricionais, se complexam com o cálcio, que se torna indisponível à absorção intestinal (PERRY et al., 1991).

Diante disso, inúmeros programas nutricionais vêm sendo estudados, como a suplementação de vitaminas, com o objetivo de obter dietas com o melhor desempenho produtivo, qualidade óssea e bem-estar das aves. As diferentes formas e fontes de vitaminas D, tem expressiva participação no metabolismo ósseo, sendo responsáveis pelo crescimento e manutenção do tecido esquelético (BRITO et al., 2010).

### 2.1.3 Avaliação da qualidade óssea:

Diversas tecnologias podem ser utilizadas para avaliar a integridade óssea. Algumas medidas que auxiliam na identificação de distúrbios ósseos utilizam técnicas invasivas, como os teste biomecânicos: a densitometria, resistência óssea à quebra, composição mineral, índice de Seedor, além do teor de cinzas, cálcio e fósforo (ALMEIDA PAZ et al., 2008).

A densitometria óssea representa a massa de material por volume de osso que inclui a parte orgânica e inorgânica. Como a maior parte do osso é representada pela matriz inorgânica, essa medida reflete o grau de mineralização e risco de fraturas

(RATH, et al., 2000). De acordo com Almeida Paz et al. (2006), a densidade pode ser afetada pela expressão de proteínas responsáveis pelo desenvolvimento corporal e, também, pelo fornecimento inadequado de nutrientes. Além disso, fatores como a idade, o sexo, tipo de produção, dieta e manejo também podem influenciar a densidade óssea. A análise de densitometria óssea é uma ferramenta que pode ser utilizada para avaliação da qualidade óssea de frangos de corte devido a alta confiabilidade, uma vez que no processo radiográfico é utilizada uma escala de alumínio que permite a comparação e reprodutibilidade.

A fragilidade óssea pode ser definida como susceptibilidade do osso a fraturas. Os parâmetros biomecânicos como resistência à quebra são mensurados através de ensaios realizados por tração e compressão, e baseiam-se na quantidade e qualidade relativa de colágeno, água e mineral no osso. O ensaio de flexão, o mais utilizado para ossos cilindros como o fêmur, mede a capacidade do osso em resistir à fratura através de uma força aplicada no centro ósseo. A força de quebra depende da forma e tamanho ósseo, além dos constituintes ósseos (TURNER; BURR, 1993).

As anormalidades ósseas também resultam em redução do bem-estar das aves, uma vez que prejudicam o deslocamento destas para alimentar-se e beber água, comprometendo o desenvolvimento e sanidade (COTO et al., 2008). A avaliação do bem-estar das aves pode ser realizada através de seu caminhar por uma avaliação conhecida como gait score, que é uma medida subjetiva da habilidade da ave em caminhar sobre uma superfície, a fim de avaliar o seu bem-estar e que pode ser realizada no aviário (KESTIN et al., 1992). Alguns mercados importadores utilizam essa medida, sendo uma exigência necessária a exportação.

## 2.2 CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO MUSCULAR

A miogênese é o processo celular responsável pela origem do tecido muscular, que pode ser dividida em duas etapas: a determinação e a diferenciação. A determinação é o processo no qual as células pluripotentes estão se multiplicando e são mobilizadas para o processo miogênico, se convertendo em mioblastos. Na diferenciação, ocorre a migração dos mioblastos, proliferando-se e alinhando-se no tecido conjuntivo, fundindo em seguida, formando miotubos multinucleados, localizados no centro de cada célula, perdendo a capacidade de divisão (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Os miotubos, por sua vez, passam por um processo chamado de modulação, quando a síntese de proteína miofibrilar é acelerada, originando as fibras musculares, também chamadas de fibras primárias. Em um segundo estágio do desenvolvimento, utilizam as miofibrilas primárias como suporte para alinharem-se e formam as fibras secundárias. Essas por sua vez, passam por hipertrofia e se ligam a outros miotubos através de uma forte ligação permitindo a comunicação célula a célula (LOPES, 2010).

Existem diversos fatores regulatórios da miogenese, proteínas que funcionam como ativadoras da transcrição, se ligando através de sítios específicos ao DNA (ácido desoxirribonucléico), controlando o desenvolvimento muscular. Fatores de crescimento também atuam na regulação positiva ou negativa do processo de miogênese (SILVA; CARVALHO, 2007).

Além das fibras primárias e secundárias, uma terceira população de mioblastos não forma fibras musculares, mas ficam localizadas próximas as miofibras, e são chamadas de células satélites. As células satélites estão localizadas entre a membrana e a lâmina basal da fibra muscular. É uma célula mononucleada e mitoticamente ativa durante a fase de hipertrofia (SOUZA et al., 2015).

Durante o período de crescimento pós-nascimento do animal, o crescimento muscular ocorre somente por hipertrofia (aumento do tamanho da célula) principalmente pelo acréscimo de proteína e de núcleos originados da proliferação e fusão da célula satélite a célula muscular (LOPES, 2010). A hipertrofia ocorre primeiramente no sentido longitudinal da fibra pelo aumento do número de sarcômeros e, posteriormente, ocorre um aumento do diâmetro pela deposição de proteínas miofibrilares. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

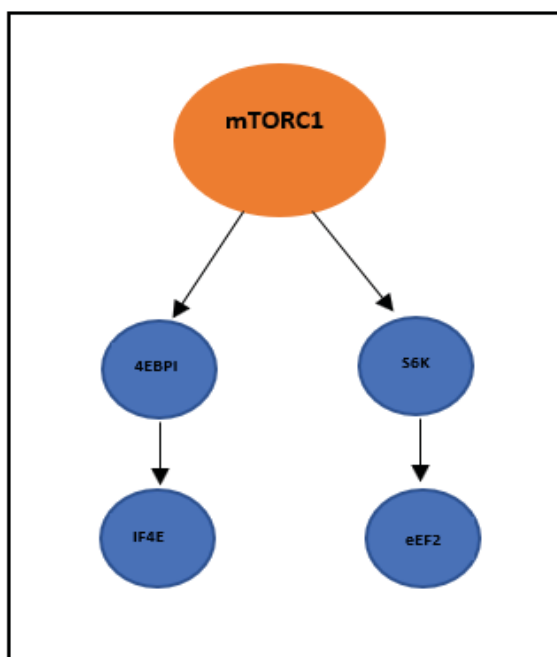
A síntese de novas proteínas musculares ocorre por processos de fluxo de informação gênica, que se iniciam com a replicação do DNA, passando pela síntese e processamento de RNA (transcrição) e culminando com a síntese proteica (tradução) (CRYSTAL, 1995). Estes processos sequenciais, são passíveis de regulação em vários pontos em respostas à estímulos específicos. A modulação do sinal é dependente da ativação de determinados genes e a transmissão deste sinal é realizada através da fosforilação por proteínas chamadas cinases (CORTOT et al., 2006).

Um mecanismo presente na musculatura é a via mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos). A proteína mTOR é uma cinase serina/treonina que regula o crescimento celular e desempenha um papel fundamental na regulação da síntese



de proteína (Figura 2). Uma vez ativado, o mTOR tem a capacidade de regular o processo de síntese proteica, através de alvos - S6k ( proteína quinase ribossomal S6 beta -1), 4E-BP1 ( proteína 1 de ligação ao fator de iniciação da tradução eucariótica) e o eEF2 (fator de alongação eucariótico 2) - promovendo a tradução protéica (FERNANDES et al., 2008).

FIGURA 2 – VIA mTOR



FONTE: ASCENÇÃO, 2014

A vitamina D participa da regulação do crescimento dos miócitos e do volume da massa muscular, do tônus e da força muscular, a partir de ações genômicas e não genômicas, estas últimas por meio do controle do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e mudanças na voltagem das membranas das fibras musculares (VISSER et al., 2003).

A suplementação de 25-OHD3 estimula a atividade de células satélites do músculo *pectoralis major* da ave, sendo assim, aumenta o rendimento muscular através da hiperplasia da fibra muscular (HUTTON et al. (2014). Também é possível o aumento da síntese muscular através da estimulação da via mTOR (VIGNALE et al., 2015). Os efeitos biológicos da vitamina D são mediados pelo seu receptor (VDR, *vitamin D receptor*), um fator de transcrição que pertence à família de receptores hormonais nucleares 1. O VDR é expresso em quase todas as células e regula a expressão do gene mTOR, que atuam na síntese proteica, induzindo a expressão de proteínas que participam da tradução do RNA mensageiro (CASTRO, 2011).

Portanto, o aumento do tamanho da fibra muscular está limitado por fatores genéticos e nutricionais que irão determinar a capacidade do músculo sintetizar proteínas musculares.

### 2.2.1 Miopatias

Miopatia é termo utilizado para qualquer alteração na normalidade do tecido muscular. Na avicultura, duas desordens na musculatura do peito têm sido descritas, a *White Stripping* (WS) e *Wooden Breast* (WB), ambas associadas com o comprometimento da aparência e das propriedades funcionais da carne e por isso representam um grande desafio na produção de carne de frangos de corte.

A *white stripping* está relacionada ao aparecimento de estrias brancas paralelas as fibras musculares na superfície dos músculos peitorais maiores, sendo facilmente evidenciadas nos cortes crus (KUTTAPAN et al., 2012). Embora o *white striping* não esteja relacionado com nenhuma alteração na carne de frango cozida, ele afeta a aparência da carne crua de modo que pode levar os consumidores a não escolherem determinado produto em virtude de sua aparência (MCKEE et al., 2010).

A miopatia denominada *wooden breast*, também conhecida como peito amadeirado caracteriza-se pela presença de áreas com textura endurecida na superfície do peito, as quais são pálidas (SIHVO et al., 2014). Além disso a carne com a presença de *wooden breast* diminui a sua qualidade, com redução da capacidade de retenção de água e alterações na textura.

Mutryn et al. (2015), verificou a probabilidade de vários fatores que contribuem para o *wooden breast*, como a hipóxia muscular localizada, os danos do estresse oxidativo para o músculo afetado e o aumento dos níveis de cálcio intracelular. Também tem sido demonstrada que a alimentação de alta eficiência dos frangos de corte modernos, que apresentam elevados rendimentos de peito, assim como rápido crescimento, é um fator predisponente ao aparecimento dessa doença.

A seleção genética para o crescimento do musculo peitoral tem sido realizado através da hipertrofia das fibras musculares, resultando em aumento do diâmetro das fibras, reduzindo o espaço para o tecido conjuntivo. Adicionalmente, à medida que o diâmetro das fibras aumenta, há uma diminuição concomitante na densidade capilar, pois os capilares que cercam as fibras são deslocados, limitando o fornecimento de oxigênio e a difusão na fibra muscular, induzindo a uma esquemia (JOINER, 2014).

Apesar de as miopatias podem ter etiologias multifatoriais, estratégias nutricionais devem ser avaliadas a fim de buscar um equilíbrio entre o desempenho e a diminuição das ocorrências dessas anormalidades.

### 2.2.2 Qualidade e rendimento da carne

A seleção genética na indústria de frangos de corte resultou em melhorias no desempenho e nas características de carcaça. Nas últimas décadas, a ênfase tem sido direcionada ao rendimento carne, principalmente, em aumento na produção de peito em resposta às demandas do consumidor, além disso a qualidade de carne tem sido amplamente estudada afim de buscar melhorias na qualidade de carne alterando características da carne de frango.

A aparência, textura, suculência, odor e sabor são características perceptíveis que influenciam a qualidade de carne e, principalmente, o julgamento do consumidor antes e depois de comprar o produto. Além disso, para os produtos processados e produtos cárneos de valor agregado, as propriedades da carne quantificáveis como capacidade de retenção de água, força de cisalhamento, perda de água por cozimento ou gotejamento, pH, solubilidade, capacidade de ligação de gordura e prazo de validade, por exemplo, são indispensáveis para adquirir propriedades funcionais, que garantem a qualidade do produto final e na lucratividade.

A maciez e a coloração da carne são características importantes, principalmente, ao consumidor. Esses atributos sensoriais da carne podem ser afetados por fatores intrínsecos como a idade ao abate, sexo, linhagem e o tipo de músculo (ZEOLA et al., 2002). Embora todas as linhagens existentes no mercado sejam de alto rendimento, apresentam diferenças entre si, já que dependem da seleção aplicado no programa de formação da linhagem. Desse modo, o rendimento de carcaça pode variar dentro de uma mesma linhagem conforme a idade e peso de abate (MENDES, 2001). Entre machos e fêmeas as diferenças quanto à deposição de carne de peito também são existentes, podendo ser observados a partir dos 28 dias de idade das aves (MENDES, 2001).

Nesse contexto vários fatores estão envolvidos que podem alterar a qualidade da carne, o aspecto visual, a qualidade nutricional e até mesmo o processamento (PETRACCI et al., 2014). A qualidade de carne de frango é potencialmente afetada pela densidade de aves alojadas (FEDDES et al., 2002), ambiência, condições de

manejo e criação (BERTOL, 2004), nutrição, transporte, abate e no processamento de carne (SWATLAND, 2004).

A nutrição tem um impacto significativo na qualidade de carne. A alimentação com dietas de baixo teor de gordura e carboidrato, para as aves, influenciam em características sensoriais (MORAN, 2001), diminuição do rendimento de carcaça e carne de peito e da gordura na carcaça (SMITH et al., 2002). Enquanto que dieta com alta densidade nutricional resultam em maior rendimento de carcaça e gordura na carcaça (HESS; BILGILI, 2004).

O uso de vitaminas para fins zootécnicos em animais é justificável, já que beneficiam o desenvolvimento do animal, aumenta a sua resistência a doenças e o seu desempenho produtivo. Além dos benefícios zootécnicos as vitaminas quando suplementadas adequadamente aos animais são capazes de propiciar benefícios à qualidade da carne. A vitamina D<sub>3</sub> ou seus metabolitos pode elevar a concentração de cálcio no músculo, aumentar a atividade da calpaína e melhorar a degradação post-mortem das proteínas miofibrilares, aumentando a maciez da carne (FOOTE et al., 2004)

A qualidade de carne depende de múltiplos fatores e envolve um processo complexo. Dessa forma, entendendo os pontos críticos na produção de carne de frangos e estratégias nutricionais é possível investir na resolução de problemas e consequentemente redução de perdas.

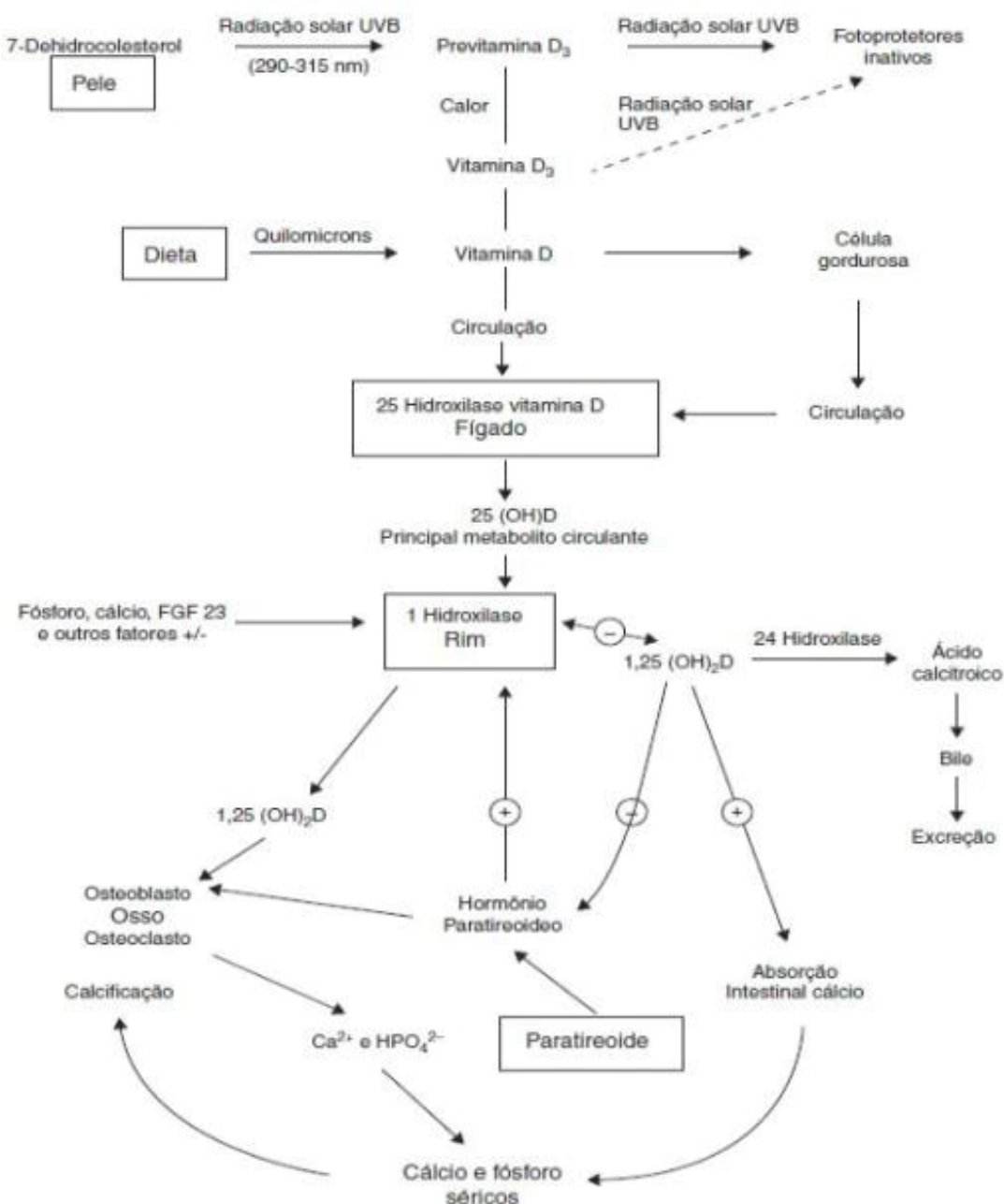
## 2.3 SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D

Segundo McDowell e Russel (2000) as vitaminas são definidas como um grupo de compostos orgânicos complexos essenciais ao metabolismo. Caracterizam-se por serem necessárias em pequenas quantidades diárias para funções fisiológicas do metabolismo, manutenção da saúde, crescimento e desenvolvimento do animal. As vitaminas são classificadas em dois grupos em função da solubilidade, lipossolúveis e hidrossolúveis. Vitaminas A, D, E e K são lipossolúveis, enquanto a vitamina C e do complexo B são classificadas como hidrossolúveis.

A vitamina D é considerada a “vitamina do sol”, pois é sintetizada quando exposta a luz solar suficiente. As duas principais fontes naturais de vitamina D são o colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>) e ergocalciferol (vitamina D<sub>2</sub>) (McDOWELL; RUSSEL, 1989). O ergosterol, originado de esteroides das plantas, através da radiação solar é

convertido em ergocalciferol, utilizado como fonte de vitamina D nas rações. Já o colecalciferol é produzido exclusivamente pelos animais, por meio da conversão do 7-deidrocolesterol, sintetizado no fígado, estando presente em grandes quantidades na pele, mucosa intestinal, entre outros, sendo convertido também pela incidência de luz solar, conforme apresentado na Figura 3 (BERTECHINI, 2006).

FIGURA 3 – FORMAÇÃO DA VITAMINA D E SEUS METABÓLITOS



FONTE: HOLICK, 2007.

### 2.3.1 Vitamina D e metabólitos relacionados

A vitamina D obtida da dieta é absorvida a partir do intestino delgado em associação com os lipídios, como toda vitamina lipossolúvel (McDOWELL; RUSSEL, 1989), pela ação de ácidos, sais biliares e das lipases. A vitamina D<sub>3</sub> não é biologicamente ativa, dessa forma é necessárias duas reações sequenciais de hidroxilação para que ocorra conversão *in vivo* na forma ativa da vitamina D, que ocorrem após absorção pela mucosa intestinal (CHAMPE; HARVEY, 1996).

A vitamina D<sub>3</sub> presente na corrente sanguínea, circula em concentrações relativamente baixas, devido ao rápido acúmulo no fígado. Uma vez no fígado, a primeira, conversão ocorre por meio da adição de OH na posição 25 da cadeia lateral de carbonos, reação catalisada pela hidroxilase específica encontrada no fígado. Esse órgão é o principal local da 25-hidroxilação da vitamina D, no entanto, o rim e o intestino também podem produzir 25-OHD<sub>3</sub>, embora a hidroxilação nesses órgãos seja pouco representativa. (McDOWELL; RUSSEL, 1989).

O metabólito 25-OHD<sub>3</sub> é posteriormente hidroxilado na porção primária por uma enzima específica, 25 hidroxicolecalciferol 1-hidroxilase, encontrada principalmente no rim. O resultado é a formação do composto denominado 1,25 dihidroxicolecalciferol (1,25-OH<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>) (CHAMPE; HARVEY, 1996). Esse composto que é formado no rim é então transportado para o intestino e, ossos e está envolvido no metabolismo de Ca e P (McDOWELL; RUSSEL, 1989).

Na mucosa duodenal, o 1,25-OH<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> estimula a absorção ativa de Ca pelos enterócitos., devido à participação nos processos de expressão de proteínas responsáveis pela captação do cálcio. No jejuno, a absorção é passiva, de modo que a 1,25-OH<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> estimula a expressão de paracelinas, proteínas intercelulares, que formam canais por onde o Ca é transferido passivamente por gradiente de concentração (CASTRO, 2011). O metabólito, juntamente com o paratormônio (PTH), atua na manutenção dos níveis plasmáticos de Ca e P pela mobilização de Ca a partir do osso e redução da perda dos minerais pelos rins (GALVÃO et al., 2013). Sendo assim, a vitamina D é requerida para crescimento normal, maturação, mineralização e manutenção do tecido ósseo maduro.

Entre as ações do 1,25-OH<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> está a estimulação da síntese de proteína ligadora de cálcio no intestino delgado, e assim, obtendo efeitos rápidos na absorção de cálcio no intestino. O resultado é um aumento da concentração de cálcio e fosfato para a circulação reduzindo a formação de complexos com o cálcio e,



consequentemente, os problemas ósseos (APPLEGATE et al., 2003; MILLER et al., 2006).

Dentre os metabolitos ativos da vitamina D produzidos artificialmente, os de interesses comerciais são o 25-hidroxicolecalciferol e o 1,25-dihidroxicolecalciferol (BRITO, 2010). O primeiro tem maior potencial de substituição à vitamina D<sub>3</sub>, visto que o 1,25-OH<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> pode ser tóxico até mesmo em pequenas inclusões. Além disso, ele é cerca de três vezes mais potente quando a característica em questão é a concentração de cálcio plasmático (SOARES JR et al., 1995).

Os metabolitos têm como vantagem a presença na estrutura química de uma hidroxila, quando comparados a vitamina D, o que confere maior polaridade nas moléculas, possibilitando incrementar a absorção no trato gastrointestinal e melhorar o transporte plasmático para levar ao processo de ativação da vitamina D (WARD, 2004). Além disso, estes precisam apenas da hidroxilação no rim regulado pela presença do paratormônio na posição 1 no caso da 25-OHD<sub>3</sub> ou da hidroxilação não controlada no fígado na posição 25 no caso da 1 $\alpha$ -OHD<sub>3</sub> (CRENSHAW; RORTVEDT; HASSEN, 2011).

De acordo com Phadnis e Nemere (2003), o 25-OHD<sub>3</sub> possui receptores mais específicos nos tecidos onde realiza as funções biológicas, assim sugere a existência de mecanismos de ação alternativos. Ao passo que, proteínas de transporte do 25-OHD<sub>3</sub> têm sido identificadas e isoladas (SITRIN et al., 1982).

Os resultados de vários estudos mostraram que a 25-OHD<sub>3</sub> tem maior atividade biológica, e é fonte mais eficiente de vitamina D<sub>3</sub> em dietas de aves do que o colecalciferol. Bar et al. (1980) relatou que, em frangos de corte, a absorção de 25-OHD<sub>3</sub> é 83% mais rápida quando comparada a vitamina D<sub>3</sub>. Essa maior rapidez pode ser atribuída à sua ligação com as proteínas intestinais que possuem afinidade ao metabólito 25-OHD<sub>3</sub>, que é pelo menos mil vezes maior do que para outros metabólitos da vitamina D<sub>3</sub> (TEEGARDEN et al., 1997).

### 2.3.2 Efeitos da vitamina D<sub>3</sub> e metabólitos sobre a produção de frangos de corte

Yarger et al. (1995) relataram que a substituição do colecalciferol por 25-OHD<sub>3</sub> (69, 207 e 690 mcg/kg) em dietas de frangos de corte melhorou o ganho de peso e a conversão alimentar. Da mesma forma, Koreleski e Swiatkiewicz (2005) observaram efeitos positivos da substituição parcial e completa de colecalciferol (1500 UI) por 25-OHD<sub>3</sub> (25, 50 e 100%) no desempenho de frangos de corte e na

concentração de cálcio na tíbia. Em estudo Fritts e Waldroup (2003) observaram uma melhora no ganho de peso corporal em frangos de corte alimentados com dieta contendo 4.000 UI/kg de colecalciferol.

Em estudos mais recentes, Wideman et al. (2015) observaram que a suplementação de 25-OHD3 via água potável (33,9 µg 25-OHD3 / L) resultou em menor incidência de claudicação em frangos de corte. Afim de avaliar a bioatividade relativa de 25-OHD3, com base na análise da mineralização do fêmur, tíbia e metatarsus, Han et al. (2016) observaram que a 25-OHD3 (5mcg/kg) foi aproximadamente duas vezes mais ativo quanto o colecalciferol no ganho de peso e na resistência óssea de frangos de corte.

Sakkas et al. (2018), ao avaliarem diferentes dosagens de vitamina D<sub>3</sub> (1000, 4000 e 7000 UI) com substituição parcial de 25-OHD3 (1000 UI D<sub>3</sub> + 3000UI 25-OHD3), verificaram melhorias consistentes na mineralização óssea no final do período de crescimento de frangos de corte.

Além do papel na regulação óssea, estudos identificaram que a vitamina D possui papel no desenvolvimento muscular, a 1,25-OH<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> participa da regulação do crescimento dos miócitos e do volume da massa muscular, do tônus e da força muscular, a partir de ações genômicas e não genômicas, estas últimas por meio do controle do influxo de Ca<sup>2+</sup> e mudanças na voltagem das membranas das fibras musculares (VISSER, 2003).

Com o objetivo de avaliar o efeito da substituição de um alto nível dietético de colecalciferol (5.520 UI / kg) por 25-OHD3 no desempenho, produção de carne de peito e síntese de proteína muscular, Vignale et al. (2015) não observaram diferença no desempenho produtivo, no entanto, o metabólito 25-OHD3 aumentou o rendimento de carne de peito, a síntese de proteína muscular, bem como a concentração de 25-OHD3 no plasma. Com base na análise genômica, esses autores indicaram que os mecanismos moleculares da 25-OHD3 no músculo proliferação e desenvolvimento foram mediados pela via mTOR-S6K. Em outro estudo, Hutton et al. (2014) avaliaram a substituição parcial da vitamina D<sub>3</sub> ( 5.000 UI D<sub>3</sub> ) por 25-OHD3 (2.240 UI/kg D<sub>3</sub> + 2.760 UI/kg 25-OHD3), mostrando efeito positivo no mecanismo de 25-OHD3 na produção de carne de peito em frangos de corte. Esses autores observaram melhora dos níveis circulantes de vitamina D<sub>3</sub> no organismo e estimulação da atividade das células satélites do músculo esquelético no músculo peitoral.

A suplementação dos diferentes metabólitos, juntamente com uma fonte de vitamina D<sub>3</sub>, é um método para maximizar o desempenho animal, pois fornece aos animais uma forma de armazenamento de vitamina D. Os metabólitos atuam em conjunto com a vitamina D para reduzir o gasto de energia, aumentando a resultados (GARCIA et al., 2013).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi avaliar a inclusão de 25-OHD3 em dietas iniciais, de crescimento ou abate suplementadas com vitamina D<sub>3</sub> sobre o desempenho produtivo, integridade óssea, rendimento de carcaça e cortes comerciais de frangos de corte.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a inclusão de 25-OHD3 em dietas iniciais, de crescimento ou abate suplementadas com vitamina D<sub>3</sub> sobre:

- Ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar;
- Integridade óssea de tíbia, fêmur e úmero (crescimento ósseo, densidade mineral, resistência óssea, relação tecido cartilaginoso: tecido ósseo, número de poros/ $\mu\text{m}^2$ );
- *Gait score*;
- Rendimento de carcaça e de cortes comerciais;
- Qualidade da carne;
- Níveis séricos de 25-OHD3;
- Deposição de proteína bruta na carne do peito;
- Expressão gênica do mTOR na carne do peito;
- Ocorrência de miopatia na carne do peito;

## **CAPÍTULO 1: SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE 25-HIDROXICOLECALCIFEROL (25-OH-D<sub>3</sub>) EM DIFERENTES FASES DE CRIAÇÃO SOBRE O DESEMPENHO PRODUTIVO E A QUALIDADE ÓSSEA DE FRANGOS DE CORTE**

**RESUMO:** O experimento teve por objetivo avaliar a inclusão de 25-hidroxicolecalciferol (25-OHD<sub>3</sub>) em dietas iniciais, de crescimento ou abate suplementadas com vitamina D<sub>3</sub> sobre o desempenho produtivo, bem-estar e integridade ósseas de frangos de corte de 1 a 46 dias de idade. Para isso, foram utilizados 1584 pintos de corte Ross®, machos. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos de 9 repetições com 44 aves cada (12,5 aves/m<sup>2</sup>). Os níveis de suplementação de vitamina D foram fornecidas em concentrações iguais (3,000 UI/kg de ração) em todas as dietas. A dieta controle (DC) continha 3,000 UI D<sub>3</sub> por kg de ração, oferecida no período de 1 a 46 dias, enquanto as dietas experimentais continham 3000 UI D<sub>3</sub> + 2760 UI de 25-OHD<sub>3</sub> por kg de ração, oferecidas em três programas de alimentação: 1 a 21, 1 a 35 e 1 a 46 dias. A inclusão de 25-OHD<sub>3</sub> nas rações para frangos de corte em diferentes períodos de criação não alterou ( $p>0,05$ ) os parâmetros de desempenho produtivo e *gait score*. Nas medidas ósseas houve correlação positiva ( $r=0,291$ ) entre a densitometria óssea e os níveis séricos de 25-OHD<sub>3</sub> quando suplementado durante toda a criação. Os demais índices ósseos não foram afetados pela suplementação de 25-OHD<sub>3</sub> associado a vitamina D<sub>3</sub> nos diferentes programas. A suplementação de 25-OHD<sub>3</sub> associado a vitamina D<sub>3</sub> não influenciou o desempenho produtivo dos frangos de corte e a integridade óssea de frangos de corte suplementados em diferentes fases de criação.

**Palavras-chave:** mineralização óssea, conversão alimentar, *gait score*

## CHAPTER 1: DIETARY SUPPLEMENTATION OF 25-HYDROXYCOLECALCIFEROL (25-OH-D3) IN DIFFERENT CREATION PHASES ON THE PRODUCTIVE PERFORMANCE AND BONE QUALITY OF BROILERS

**ABSTRACT:** The objective of this experiment was to evaluate the inclusion of 25-hydroxycholecalciferol (25-OHD3) in initial, growth or slaughter diets supplemented with vitamin D3 on the productive performance, well-being and integrity of broiler chickens from 1 to 46 days of age. For this, 1584 Ross® male broilers were used. The experimental design was completely randomized with 4 treatments of 9 replicates with 44 birds each (12.5 birds / m<sup>2</sup>). Vitamin D supplementation levels were given in equal concentrations (3,000 IU / kg of feed) in all diets. The control diet (DC) contained 3,000 IU D3 per kg of feed, offered in the period from 1 to 46 days, while the experimental diets contained 3000 IU D3 + 2760 IU of 25-OHD3 per kg of feed, offered in three programs of feed: 1 to 21, 1 to 35 and 1 to 46 days. The inclusion of 25-OHD3 in broiler rations at different breeding periods did not change ( $p > 0.05$ ) the parameters of productive performance and gait score. In the bone measurements, there was a positive correlation ( $r = 0.291$ ) between bone densitometry and serum levels of 25-OHD3 when supplemented during all breeding. The other bone indices were not affected by vitamin D3 supplementation of 25-OHD3 in the different programs. The supplementation of 25-OHD3 with vitamin D3 did not influence the productive performance of broiler chickens and the bone integrity of broilers supplemented at different stages of rearing.

**Key words:** bone mineralization, feed conversion, *gait score*

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a seleção genética de frangos de corte tem buscado, entre outras características, melhorar substancialmente o crescimento e a eficiência alimentar (SIEGEL, 2014; BOZKUT et al., 2017). Como resultado, o frango de corte moderno é altamente eficiente na conversão de ração em produção de massa muscular (SCHMIDT et al., 2009).

Entretanto, maiores taxas de crescimento resultaram em desequilíbrio entre o crescimento muscular e esquelético (BROWNING; COWIESON, 2015) e, aumentaram as incidências de anormalidades esqueléticas do sistema locomotor em aves (WILLIAMS et al., 2004) e uma gama de distúrbios indesejáveis, como as deformidades angulares dos ossos longos (*Valgus e Varus*), discondroplasia tibial, degeneração femural. A claudicação é também uma questão que leva a enorme perda produtiva anualmente devido ao baixo crescimento (RATH et al., 2000) promovendo perdas econômicas significativas.

Em vista disso, a saúde óssea tem sido um componente de estudo importante para promover o bem-estar das aves e melhorias na economia da produção de frangos de corte (KAPELL et al., 2012). Uma das estratégias para melhorar a estrutura óssea é a vitamina D na dieta (BOZKUT et al., 2017). A vitamina D está estreitamente relacionada ao metabolismo de cálcio (Ca) e fósforo (P), assim na falta de algum deles, há o comprometimento da homeostase destes minerais comprometendo a formação óssea.

Vários estudos mostraram que a principal forma circulante da vitamina D, a 25-hidroxicolecalciferol (25-OHD<sub>3</sub>) tem maior atividade biológica e é fonte mais eficiente da vitamina D<sub>3</sub> em dietas para frangos de corte (BAR et al., 1980; YARGER et al., 1995; KORELESKI; SWIATKIEWICZ, 2005; MICHALCZUK et al., 2010; MORRIS et al., 2014; HAN et al., 2016). O metabólito tem demonstrado, em geral, melhorar o desempenho produtivo e a saúde esquelética em aves (YARGER et al., 1995; FRITTS; WALDROUP, 2003; WHITEHEAD et al., 2004; GARCIA et al., 2013). Assim, o impacto do 25-OHD<sub>3</sub> na saúde óssea e no desenvolvimento do músculo esquelético é uma área interessante na pesquisa em produção de frangos de corte.

Em estudos recentes, Wideman et al. (2015) observaram que o fornecimento de 25-hidroxicolecalciferol, via água de bebida, refletiu em menor incidência de claudicação em frangos de cortes. Ao avaliarem a bioatividade relativa de 25-OHD<sub>3</sub>,

Han et al. (2016) observaram que o metabólito foi duas vezes mais ativo que o colecalciferol em promover ganho de peso e resistência óssea em frangos de corte.

Os primeiros 21 dias do desenvolvimento das aves são marcados pelo rápido desenvolvimento e também por mudanças fisiológicas importantes, tais como: desenvolvimento do sistema termorregulador; início do desenvolvimento de imunocompetência, desenvolvimento de músculos, sistema ósseo e gordura; portanto, o comprometimento dessa fase afeta negativamente o desempenho final do lote (ABREU, 2009). Durante o crescimento, a deficiência de cálcio leva a uma calcificação incompleta da matriz orgânica produzida (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), desencadeando patologias ósseas que surgem a partir da 3 semana e que comprometem o desempenho e bem-estar das aves. Além disso, o alto ganho de peso final das aves, somado a baixa mineralização óssea leva a problemas como fratura que geram grandes perdas no abatedouro (PAZ, 2008).

Desta forma, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas visando esclarecer os níveis a serem utilizados de vitamina D<sub>3</sub> e seus metabólitos diante da variação dos valores recomendados em rações de frangos de corte. No entanto, ainda são poucos os estudos que buscam fornecer diferentes estratégias de programas de alimentação afim de reduzir os prejuízos econômicos na produção avícola.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da inclusão de 25-OHD<sub>3</sub> em dietas iniciais, de crescimento e abate suplementadas com vitamina D<sub>3</sub> sobre o desempenho, bem-estar animal (*gait score*) e integridade óssea de frangos de corte de 1 a 46 dias.

## MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor Palotina da Universidade Federal do Paraná – UFPR, sob o protocolo número 51/2014.

### Aves e Delineamento experimental:

O experimento foi realizado no aviário experimental da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina. Foram utilizados 1584 pintos de corte machos, de um dia, da linhagem Ross® Ap95, distribuídos de acordo com um delineamento experimental



inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 9 repetições cada, totalizando 36 unidades experimentais (Tabela 1).

A vitamina D foi fornecida em concentrações iguais (3.000 UI/kg de ração) como vitamina D<sub>3</sub> em todas as dietas. A dieta controle (DC) continha 3.000 UI D<sub>3</sub> por kg de ração, enquanto que as dietas experimentais continham 3000 UI D<sub>3</sub> + 2.760 UI de 25-OHD3 por kg de ração

TABELA 1 - TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS

Tratamentos	Vitamina D (UI/kg)	25-OHD3* (UI/kg)	Total Atividade vitamina D	Período (dias)
T1	3.000	-	3.000	1 - 46
T2	3.000	2.760	5.760	1 - 21
	3.000	-	3.000	22 - 46
T3	3.000	2.760	5.760	1 - 35
	3.000	-	3.000	36 - 46
T4	3.000	2.760	5.760	1 - 46

\* 1 micrograma de colicalciferol = 40 UI.

Dietas experimentais:

As rações experimentais foram formuladas à base de milho e farelo de soja, em programa de alimentação com três fases: inicial (1 a 21 dias), crescimento (22 a 35 dias) e abate (36 a 46 dias) na forma farelada. Para cada fase formulou-se rações seguindo as recomendações nutricionais praticadas pelas integrações avícolas da região de acordo com o resultado bromatológicos dos ingredientes (Tabela 2). As rações foram fornecidas *ad libitum* na forma farelada e coletadas amostras para verificação dos níveis formulados (Tabela 3).

As concentrações de vitamina D utilizada nas dietas experimentais foram calculadas com base nas diretrizes de Suplementação de Vitaminas da DSM (ROVIMIX Hy-D; DSM Nutritional Products, Basel, Switzerland) para frangos de corte (DSM, 2012). O metabólito da vitamina D<sub>3</sub>, 25-OHD3, foi adicionado via premix, sendo avaliada a recuperação nas rações, as quais se encontraram dentro dos níveis acrescidos às rações experimentais (Tabela 4).

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO E NÍVEIS NUTRICIONAIS DAS RAÇÕES NAS FASES INICIAL (1 A 21 DIAS), CRESCIMENTO (22 A 35 DIAS) E ABATE (36 A 46 DIAS) DE FRANGOS DE CORTE.

Ingredientes, kg	Inicial	Creascimento	Abate
Milho <sup>1</sup>	601,77	638,48	690,56
Óleo de Soja	21,00	35,00	36,00
Farelo de soja <sup>1</sup>	309,00	268,0	223,00
Farinha de carne <sup>1</sup>	45,00	36,00	29,00
Sal	2,00	1,90	2,00
Calcário	5,80	5,60	5,60
Bicarbonato Sódio	2,90	2,70	2,40
DL-Metionina 98%	3,69	3,52	3,20
Biolys 50.7	2,920	3,20	3,22
Treonina 98% Pó	0,990	1,000	0,820
L-Valine 96.5	0,464	0,705	0,602
Colina 60% Pó	0,960	0,740	0,600
Salinomicina 12% <sup>2</sup>	-	0,550	-
Nicarbazina+Narasina 80/80 <sup>2</sup>	0,500	-	-
Premix vitamínico <sup>3</sup> e mineral <sup>4</sup>	3,000	3,000	3,000
Composição nutricional			
PB, %	22,00	20,00	18,00
EM, Kcal/kg	3050	3180	3250
GB, %	5,233	6,555	6,698
FB, %	2,359	2,210	2,061
Cálcio, %	0,950	0,840	0,760
P Disp., %	0,470	0,420	0,380
Lis Dig., %	1,256	1,160	1,040
AAS Dig., %	0,967	0,906	0,832
Thr Dig., %	0,829	0,767	0,687
Trp Dig., %	0,229	0,205	0,179
Val Dig., %	0,954	0,894	0,801
Na, %	0,200	0,190	0,180
Cl, %	0,240	0,240	0,240

<sup>1</sup>Milho: proteína bruta 7,5%; extrato etéreo 4,3%; fibra bruta 1,18%; umidade 12,5%; Farelo de soja: : proteína bruta 46,7% ;extrato etéreo 1,29% ;fibra bruta 4,9% ; uréase 0,01; proteína solúvel 80%; Farinha de carne: proteína bruta 48,5%; cálcio 11,59%; fosforo 5,27%;

<sup>2</sup>Anticoccidiano

<sup>3</sup>Premix vitamínico: Vit. A 9,000,000 UI/kg; Vit. D3 2,500,000 UI/kg; Vit. E 20,000 UI/kg; Vit. K3 2,500 mg/kg; Vit. B1 2,000 mg/kg; Vit. B2 6,000 mg/kg; Acido Pantotenico 12 g/kg; Vit. B6 3,000 mg/kg; Vit. B12 15,000 mcg/kg; Niancina 35 g/kg; Acido folico 1,500 mg/kg; Biotina 100 mg/kg; Selenio 250 mg por kg de premix.

<sup>4</sup>Premix mineral : Ferro100 g/kg; Cobre 20 g/kg; Manganes 130 g/kg; Cobalto 2,000 mg/kg; Zinco 130 mg/kg; Iodo 2,000 mg por kg de premix.

\*Premix tratamento suplementado com 69 mcg/kg de Rovimix HyD (25-OHD3).

TABELA 3. RESULTADOS BROMATOLÓGICO DAS RAÇÕES EXPERIMENTAIS

Fase/ Tratamento	Proteína Bruta (%)	Gordura (%)	Cinzas (%)	Fibra (%)	Cálcio (%)	Fósforo (%)
Ração Inicial T1	22,74	4,71	5,08	2,47	0,95	0,60
Ração Inicial T1/T2/T3	22,61	4,55	4,58	2,35	0,96	0,60
Ração Crescimento T1/T2	20,19	5,61	4,5	2,46	0,85	0,54
Ração Crescimento T3/T4	20,29	5,92	4,79	2,37	0,85	0,53
Ração Abate T1/T2/T3	18,91	5,42	4,44	2,66	0,78	0,49
Ração Abate T4	18,91	5,32	4,38	2,57	0,78	0,49

TABELA 4. RECUPERAÇÃO DO METABÓLITO 25-HIDROXICOLECALCIFEROL ADICIONADO NAS DIETAS EXPERIMENTAIS

Fase/ Tratamento	25-OHD3
Ração Inicial T1	< limite de detecção
Ração Inicial T1/T2/T3	67,9 ug/kg
Ração Crescimento T1/T2	< limite de detecção
Ração Crescimento T3/T4	63,4 ug/kg
Ração Abate T1/T2/T3	< limite de detecção
Ração Abate T4	63,6 ug/kg

#### Instalações e manejo das aves:

As aves foram vacinadas no incubatório contra doença de marek, gumboro e bronquite infecciosa e alojadas em galpão experimental equipados com exaustores e placas de resfriamento controlados por um sistema automatizado durante o período de 1 a 46 dias de idade. Os boxes experimentais tinham dimensão de 1,50 x 2,50 (3,75 m<sup>2</sup>) com 44 aves cada (12,5 aves/m<sup>2</sup>), sobre cama de maravalha reutilizada (4° lote). Água e ração foram fornecidos à vontade. A temperatura foi monitorada diariamente e mantida dentro da faixa de conforto térmico para atender às recomendações da Aviagen (2014). As aves receberam 24 horas de luz até os 14 dias, em função do sistema de aquecimento (lâmpada halógena de 300W), após esse período 16 horas de luz e 8 de escuro. Foi realizado manejo de cama dos 14 aos 28 dias com reviramento em dias intercalados.

#### Desempenho produtivo:

O desempenho produtivo foi avaliado nos períodos acumulados de 1 a 21, 1 a 35 e 1 a 45 dias de idade. O consumo de ração, peso corporal, ganho médio de peso corporal e conversão alimentar foram obtidos por meio de pesagens semanais da ração e das aves. Para o cálculo da conversão alimentar corrigida pela mortalidade

foi utilizado o cálculo proposto por Sakomura e Rostagno (2007). A mortalidade foi registrada diariamente para o cálculo da viabilidade criatória.

#### *Gait Score:*

Para avaliar problemas locomotores e bem-estar, aos 45 dias de idade 90 aves por tratamento foram avaliadas quanto o caminhar, conforme a metodologia proposta por Almeida Paz (2008). Esse método avalia como a ave caminha em trajeto de um metro linear e atribui-se uma nota de 0, 1 e 2, proporcional à desenvoltura da ave. Sendo 0 – a ave que caminhou normalmente e deu mais de dez passos ininterruptos, 1 – a ave que apresentou dificuldade ao caminhar e deu entre seis a dez passos ininterruptos e 2 – a ave que caminhou com muita dificuldade e deu menos de seis passos ininterruptos ou não caminhou.

#### Integridade óssea:

O abate das aves foi realizado aos 46 dias de idade. Previamente, as aves foram identificadas e submetidas ao jejum alimentar por seis horas e abatidas por atordoamento com eletricidade e posterior sangria. Foram abatidas 108 aves por tratamento (12 aves/unidade experimental), totalizando 432 aves.

Para as análises de integridade óssea foram utilizados 54 ossos/tratamento. Após remoção de todo tecido aderente da perna e asa esquerda, o fêmur, tíbia e úmero de cada ave foram submetidos à avaliação da integridade óssea.

#### Medidas ósseas:

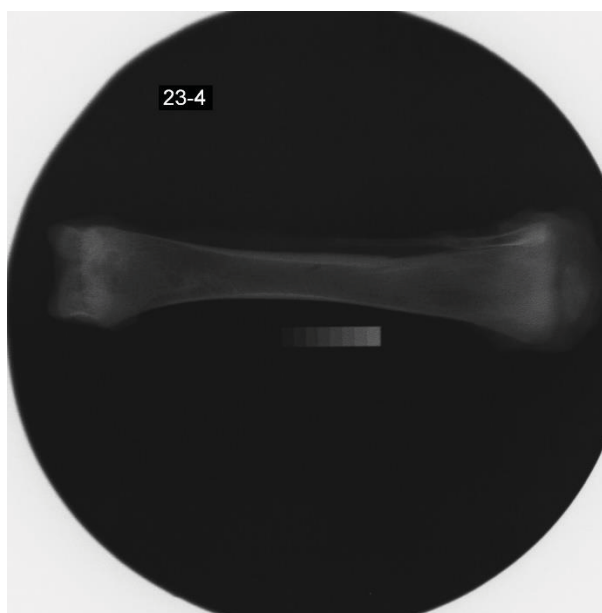
O fêmur, tíbiotarso e úmero de 54 aves/tratamento foram pesados, e medidos o comprimento e diâmetro, com auxílio de um paquímetro digital (mm). O índice de Seedor (SEEDOR et al., 1991) foi obtido pela divisão do peso dos ossos (mg) pelo seu comprimento (mm).

#### Densitometria óssea:

Para análise de densitometria óssea (densidade mineral óssea) foi realizada adaptação a metodologia de Murakami et al., (2009). Foram utilizados os tibiotarsos esquerdos de 54 aves por tratamento. Inicialmente, os ossos foram colocados sob o filme fotográfico, na posição antero-posterior, e então radiografados individualmente. Como referencial radiográfico, utilizou-se escada de alumínio (penetrômetro de

alumínio) de 10 degraus com 1 mm de espessura entre um degrau e outro, a qual foi radiografada individualmente com cada osso. Utilizou-se aparelho de raio-X, marca Procion, calibrado, modelo Ion 70x, com distância foco-filme de 45 cm, ajustado para 70 kVp, 8 mA e tempo de exposição de 0,3 segundos. Esses valores de tensão, corrente e tempo de exposição foram considerados ideais após análises prévias. As radiografias foram processadas em reveladora automática (Figura 1). A leitura das radiografias, para determinação da densidade das peças ósseas, foi realizada utilizando-se a ferramenta histograma do software Adobe Photoshop 8.0. As leituras densitométricas foram realizadas em cinco pontos na região central da imagem radiográfica e em cada degrau da escada de alumínio. Os dados obtidos em valores de cinza foram convertidos em valores relativos à espessura da escada de alumínio (mmAL), indicando a densidade mineral óssea, através de uma equação de regressão. Quanto maior o valor obtido, maior a radiopacidade e a densidade.

Figura 1– Radiografia para medição da densitometria óssea



Fonte: Autora (2019)

Resistência óssea:

O fêmur, tíbiotarso e úmero de 54 aves/tratamento foram submetidos ao teste de flexão (resistência óssea à quebra) a uma taxa de deformação constante para material viscoelástico com equipamento PMPA - Sistema de Análise de Propriedades Físico-Mecânicas Stable Micro Systems, com célula de carga de 500 kgf, velocidade do cabeçote de 10 mm/seg.

Espessura do osso cortical:

Para avaliação da espessura, o fêmur, tibiotarso e úmero submetidos ao teste de resistência óssea foram cortados novamente com serra cirúrgica oscilatória com lâmina delicada, para pequenos fragmentos. A espessura da parede cortical dos ossos foi medida na porção medial da diáfise, com auxílio de paquímetro digital (mm) na fase lateral adjacente à fíbula óssea e na região oposta, fase medial, obtendo-se três medidas das quais foi calculado o valor médio de espessura do osso cortical.

Contagem de poros do osso cortical:

Foram utilizados os tibiotarsos direito de 54 aves por tratamento. Logo após o abate, a epífise e uma porção da diáfise foram fixadas em solução de formalina tamponada (pH= 7,2)10%. Os ossos foram seccionados na região da epífise proximal, no sentido longitudinal, e na diáfise, no sentido transversal, de onde foram coletados fragmentos de 1,0 cm de cada osso, os quais foram descalcificados em ácido nítrico a 5% à temperatura ambiente até que atingissem a consistência mole.

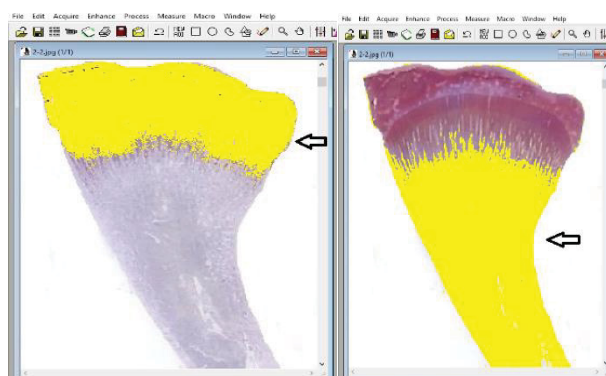
Posteriormente, fragmentos da diáfise cortadas no sentido transversal foram incluídos em parafina, cortados com auxílio de micrótomo em cortes seriados de 5  $\mu\text{m}$  de espessura e corados pelo método de Hematoxilina-eosina. A captura de imagens foi realizada por meio de câmera digital de alta resolução PRO SERIES da Mídia Cibertecnics, acoplada ao microscópio Olympus Bx 40, em aumento de 40 vezes. Para a leitura das imagens, foi utilizado um analisador de imagem computadorizado IMAGE PROPLUS 5.2 (Mídia Cibertecnics). A área foi mensurada ( $\mu\text{m}^2$ ) e em seguida contados os poros.

Relação tecido cartilaginosos: tecido ósseo:

As amostras descalcificadas da epífise proximal dos tibiotarsos foram incluídos em parafina, cortados com auxílio de micrótomo em cortes seriados de 5  $\mu\text{m}$  de espessura e corados pelo método de Hematoxilina Férrica de Weigert e Safranina O (Sigma Aldrich, EUA). A imagem longitudinal da epífise dos tibiotarsos foi capturada por um sistema de lupa acoplada a um estereomicroscópio. Para a leitura das imagens, foi utilizado um analisador de imagem computadorizado IMAGE PROPLUS 5.2 (Mídia Cibertecnics) com o objetivo de mensurar a quantidade de tecido cartilaginoso e ósseo em relação a área total do corte capturado. Para tal, atribuíam-se uma cor para a estrutura mensurada afim de estabelecer o contraste entre ambas estruturas. Através do contraste o analisador de imagens contabilizou o percentual da

cor que foi atribuída a estrutura. O procedimento foi realizado individualmente tecido cartilaginoso e tecido ósseo (Figura 2).

Figura 2 – Procedimentos para análise da relação cartilagem:osso na epífise da tíbia.



Fonte: Autora (2019).

#### Mineralização óssea:

Aos 46 dias de idade foram coletados tíbias de 27 aves / tratamento de cinzas osseas. Os ossos foram submetidos à extração de gordura por tratamento sucessivo em éter de petróleo por 8 horas, secos em estufa por 12 horas, pesados e calcinados em forno mufla a 540o C por 6 h para determinação de cinzas ósseas, conforme metodologia proposta por Silva e Queiroz, 2002.

#### Análise estatística:

Os dados foram submetidos à análise de variância (PROC GLM) em relação aos tratamentos e, quando este efeito foi significativo ( $P < 0,05$ ), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (PROC MEANS). Realizou-se também a análise de correlação simples de Pearson (PROC CORR) entre os níveis séricos de vitamina D<sub>3</sub> (25-OHD<sub>3</sub>) aos 46 dias de idade e a densitometria óssea, adotando-se o nível de significância de 5%. As análises foram realizadas no programa *Statistical Analysis System* (SAS), versão 9.0.

## RESULTADOS e DISCUSSÃO

A suplementação dietética de 25-OHD<sub>3</sub> não alterou ( $p > 0,05$ ) o consumo de ração, peso corporal, ganho de peso e conversão alimentar nas diferentes fases de criação avaliadas (Tabela 5, 6 e 7).

TABELA 5 - DESEMPENHO PRODUTIVO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D3 E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAIS NO PERÍODO DE 1 A 21 DIAS DE IDADE.

	Vit D <sub>3</sub> (UI/kg) <sup>1</sup>	25-OHD3(mcg/kg) <sup>2</sup> 1 a 21 dias	DP	P-valor
<b>1 dia</b>				
peso médio, g	45,29	45,67	0,81	0,223
<b>1 a 7 dias</b>				
Peso médio, g	179,39	180,54	6,19	0,635
Consumo de ração, g	161,81	161,41	5,76	0,859
Ganho de peso, g	134,10	134,87	6,12	0,750
Conversão alimentar	1,208	1,202	0,08	0,801
<b>7 a 14 dias</b>				
Peso médio, g	507,61	508,21	12,93	0,906
Consumo de ração, g	419,32	424,74	13,34	0,298
Ganho de peso, g	328,22	327,67	9,68	0,885
Conversão alimentar	1,278	1,297	0,04	0,233
<b>14 a 21 dias</b>				
Peso médio, g	1019,77	1024,81	24,44	0,599
Consumo de ração, g	706,38	698,32	23,29	0,376
Ganho de peso, g	512,16	516,60	19,75	0,567
Conversão alimentar	1,381	1,353	0,05	0,159
<b>1 a 21 dias</b>				
Consumo de ração, g	1287,51	1284,47	30,53	0,800
Ganho de peso, g	974,48	979,13	24,64	0,630
Conversão alimentar	1,322	1,312	0,03	0,472

<sup>1</sup>Dieta controle (DC): 3,000 UI Vitamina D<sub>3</sub>;<sup>2</sup>Dieta 21d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecida no período de 1 a 21dias;

DP: Desvio Padrão

TABELA 6 - DESEMPENHO PRODUTIVO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D3 E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAIS E DE CRESCIMENTO NO PERÍODO DE 1 A 35 DIAS DE IDADE.

	Vit D <sub>3</sub> (UI/kg) <sup>1</sup>	25-OHD3 (mcg/kg) <sup>2</sup> 1 a 21 dias	25-OHD3 (mcg/kg) <sup>3</sup> 1 a 35 dias	DP	P-valor
<b>21 a 35 dias</b>					
Peso médio, g	2439,81	2430,17	2435,24	79,44	0,969
Consumo de ração, g	2173,43	2163,02	2123,77	88,63	0,321
Ganho de peso, g	1420,04	1415,58	1405,32	66,90	0,854
Conversão alimentar	1,532	1,529	1,512	0,05	0,507
<b>1 a 35 dias</b>					
Consumo de ração, g	3460,94	3445,68	3409,14	110,22	0,478
Ganho de peso, g	2394,52	2384,00	2389,81	79,66	0,963
Conversão alimentar	1,446	1,446	1,427	0,03	0,205

<sup>1</sup>Dieta controle (DC): 3,000 UI Vitamina D<sub>3</sub>;<sup>2</sup>Dieta 21d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecida no período de 1 a 21dias;<sup>3</sup>Dieta 35d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecido no período de 1 a 35 dias;

DP: Desvio Padrão



TABELA 7 - DESEMPENHO PRODUTIVO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D3 E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAIS, DE CRESCIMENTO E ABATE NO PERÍODO DE 1 A 45 DIAS DE IDADE.

	Vit D <sub>3</sub> (UI/kg) <sup>1</sup>	25-OHD3 (mcg/kg) <sup>2</sup> 1 a 21 dias	25-OHD3 (mcg/kg) <sup>3</sup> 1 a 35 dias	25-OHD3 (mcg/kg) <sup>4</sup> 1 a 46 dias	DP	P-valor
<b>35 a 45 dias</b>						
Peso médio, g	3385,59	3360,16	3404,93	3309,37	205,51	0,793
Consumo de ração, g	1903,79	1854,78	1869,44	1781,63	212,33	0,681
Ganho de peso, g	945,78	929,99	979,96	863,87	148,69	0,422
Conversão alimentar	2,024	2,029	1,915	2,077	0,17	0,232
<b>21 a 45 dias</b>						
Consumo de ração, g	4077,22	4017,80	3996,94	3901,68	278,70	0,623
Ganho de peso, g	2365,82	2345,57	2377,02	2277,44	190,41	0,704
Conversão alimentar	1,725	1,718	1,683	1,716	0,07	0,569
<b>1 a 45 dias</b>						
Consumo de ração, g	5364,73	5300,46	5283,81	5185,56	297,85	0,662
Ganho de peso, g	3340,30	3313,99	3359,56	3263,89	205,69	0,793
Conversão alimentar	1,606	1,602	1,574	1,590	0,05	0,454

<sup>1</sup>Dieta controle (DC): 3,000 UI Vitamina D<sub>3</sub>;

<sup>2</sup>Dieta 21d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecida no período de 1 a 21dias;

<sup>3</sup>Dieta 35d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecido no período de 1 a 35 dias;

<sup>4</sup>Dieta 46d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecido no período de 1 a 46 dias;

DP: Desvio Padrão;

A suplementação dietética de 25-OHD3 nos diferentes períodos não afetou significativamente ( $p>0,05$ ) o *gait score*. (Tabela 8).

TABELA 8 - GAIT SCORE (%) DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D3 E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAIS, DE CRESCIMENTO OU ABATE NO PERÍODO DE 1 A 45 DIAS DE IDADE.

Score*	Vit D <sub>3</sub> (UI/kg) <sup>1</sup>	25-OHD3 (mcg/kg) <sup>2</sup> 1 a 21 dias	25-OHD3 (mcg/kg) <sup>3</sup> 1 a 35 dias	25-OHD3 (mcg/kg) <sup>4</sup> 1 a 45 dias	P-valor
0	42	42	37	38	> 0.05
1	45	41	48	49	> 0.05
2	3	7	5	3	> 0.05

<sup>1</sup>Dieta controle (DC): 3,000 UI Vitamina D<sub>3</sub>;

<sup>2</sup>Dieta 21d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecida no período de 1 a 21dias;

<sup>3</sup>Dieta 35d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecido no período de 1 a 35 dias;

<sup>4</sup>Dieta 46d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecido no período de 1 a 46 dias;

\* Sendo 0 – a ave que caminhou normalmente e deu mais de dez passos ininterruptos, 1 – a ave que apresentou dificuldade ao caminhar e deu entre seis a dez passos ininterruptos e 2 – a ave que caminhou com muita dificuldade e deu menos de seis passos ininterruptos ou não caminhou.

Os resultados para peso, comprimento, diâmetro, índice *Seedor* e resistência óssea à quebra do fêmur, tibia e úmero e a densitometria óssea da tibia estão apresentados na Tabela 9. A suplementação de 25-OHD3 não afetou ( $p>0,05$ ) essas variáveis nas diferentes fases de criação. É importante ressaltar que os valores

observados nesse estudo para essas características foram semelhantes para a dieta controle e para as diferentes fases de suplementação.

As medidas ósseas referentes a mineralização estão apresentadas na Tabela 10. Não foi observado alterações ( $p > 0,05$ ) nos parâmetros de densidade, espessura, relação cartilagem:osso, número de poros e cinzas dos ossos avaliados.

TABELA 9 - RESISTÊNCIA ÓSSEA À QUEBRA E MEDIDAS ÓSSEAS DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D3 E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAIS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE.

	Vit D <sub>3</sub> (UI/kg) <sup>1</sup>	25-OHD3 (mcg/kg) <sup>2</sup> 1 a 21 dias	25-OHD3 (mcg/kg) <sup>3</sup> 1 a 35 dias	25-OHD3 (mcg/kg) <sup>4</sup> 1 a 46 dias	CV %	P-valor
<b>Fêmur</b>						
Resistência óssea, kg	34,29	35,57	35,18	35,99	19,5	0,701
Peso, g	20,98	21,16	20,77	20,09	15,0	0,344
Diâmetro, mm	12,42	12,53	12,43	12,67	7,60	0,498
Comprimento, mm	86,37	86,04	85,99	86,02	5,40	0,972
Índice de Seedor	242,81	244,91	241,05	233,09	12,2	0,182
<b>Tibiotarso</b>						
Resistência óssea, kg	43,84	48,25	47,59	47,01	19,0	0,097
Peso, g	33,02	33,36	32,76	32,51	12,4	0,746
Diâmetro, mm	15,87	15,95	15,76	16,02	9,8	0,854
Comprimento, mm	121,70	119,67	122,34	120,76	4,7	0,090
Índice de Seedor	271,27	279,04	267,86	269,09	11,8	0,288
<b>Úmero</b>						
Resistência óssea, kg	34,76	35,00	36,60	35,44	21,6	0,650
Peso, g	16,77	16,40	16,34	15,49	17,0	0,103
Diâmetro, mm	10,82	10,75	11,09	11,10	11,1	0,315
Comprimento, mm	80,91	80,58	81,63	80,09	5,0	0,249
Índice de Seedor	207,45	203,24	200,52	193,13	16,3	0,160

<sup>1</sup>Dieta controle (DC): 3,000 UI Vitamina D<sub>3</sub>;

<sup>2</sup>Dieta 21d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecida no período de 1 a 21 dias;

<sup>3</sup>Dieta 35d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecido no período de 1 a 35 dias;

<sup>4</sup>Dieta 46d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecido no período de 1 a 46 dias;

CV: Coeficiente de Variação

TABELA 10 - PARÂMETROS DE INTEGRIDADE DO TIBIOTARSO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D3 E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAIS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE.

	Vit D <sub>3</sub> (UI/kg) <sup>1</sup>	25-OHD3 (mcg/kg) <sup>2</sup> 1 a 21 dias	25-OHD3 (mcg/kg) <sup>3</sup> 1 a 35 dias	25-OHD3 (mcg/kg) <sup>4</sup> 1 a 46 dias	CV %	P-valor
<b>Tibiotarso</b>						
Densitometria óssea	2,12	2,12	2,13	2,11	18,6	0,991
Espessura	1,78	1,74	1,85	1,78	2,43	0,392
Cartilagem:osso	1,29	1,25	1,37	1,26	4,32	0,086
Poros/mm <sup>2</sup>	0,112	0,121	0,114	0,110	4,17	0,874
Cinzas, %	48,14	48,37	47,38	48,12	0,90	0,839

<sup>1</sup>Dieta controle (DC): 3,000 UI Vitamina D<sub>3</sub>;

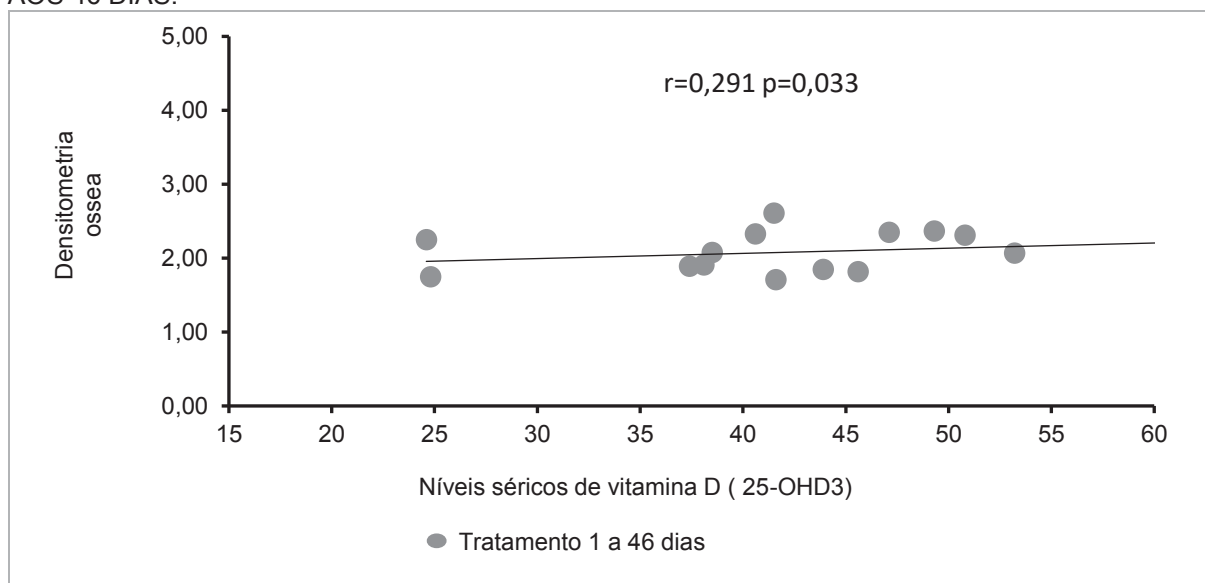
<sup>2</sup>Dieta 21d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecida no período de 1 a 21 dias;

<sup>3</sup>Dieta 35d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecido no período de 1 a 35 dias;

<sup>4</sup>Dieta 46d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecido no período de 1 a 46 dias;

Houve correlação significativa ( $r=0,29$ ,  $p<0,05$ ) com os níveis séricos de 25-OHD3, quando suplementado o metabólico associado a vitamina D<sub>3</sub> durante toda a vida produtiva das aves, conforme demonstrado na Figura 3.

FIGURA 3 – CORRELAÇÃO ENTRE A DENSITOMETRIA ÓSSEA E O NÍVEL SÉRICO DE 25-OHD3 AOS 46 DIAS.



O desempenho produtivo não foi afetado pela suplementação de 25-OHD3 nas diferentes fases de criação, o que pode ser relacionado possivelmente aos níveis adequados de nutrientes na dieta, principalmente de Ca e P, já que a eficácia da vitamina D e dos seus metabólitos tem se mostrado intrinsecamente relacionada à disponibilidade de nutrientes (WHITEHEAD et al., 2004; RAO et al., 2006, 2007, 2008). Entretanto, esperava-se que a suplementação de 25-OHD3 afetaria as variáveis medidas para um grau mais elevado quando comparado a dieta controle, já que é metabolicamente mais potente por unidade do que a D<sub>3</sub> (FRITTS et al., 2003). Contrariando essa hipótese, a suplementação de vitamina D em ambas formas não conferiu benefícios substanciais no desempenho produtivo.

Resultados semelhantes aos observados nesse estudo foram encontrados por Garcia et al. (2013) que avaliando fontes de vitamina D, D<sub>3</sub>, 25-OH-D<sub>3</sub>, 1,25 OH<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> e 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub>, fornecendo 2000 e 1600 UI de vitamina D nas fases de partida (1 a 21 dias) e fase de crescimento (22 a 42 dias) em rações de frangos também não observaram variação significativa no desempenho produtivo.

Colet et al. (2015) observaram que os níveis de suplementação alimentar de colecalciferol superiores a 3500 UI/kg não produzem melhoras adicionais em parâmetros de desempenho em frangos de corte.

Rath et al. (2007) e Chou et al. (2009) não encontraram efeitos negativos no desempenho produtivo adicionando 25-OHD3 (34,5 µg / kg e 69 µg / kg) como fonte de vitamina D<sub>3</sub> ou em combinação com níveis comerciais de vitamina D<sub>3</sub> (3000 UI) na dieta de frangos de corte. Similarmente, Bozkurt et al. (2017) não observaram melhora no ganho de peso aos 10, 24 e 38 dias quando utilizaram a 25-OHD3 (18,7-15,0 µg / kg de 25-OHD3 ) como fonte de vitamina D. Fatores como a dose de vitamina, nível mineral da dieta, genética, idade das aves e condições em que os estudos foram conduzidos podem interferir na magnitude dos resultados observados.

Castro et al. (2018), avaliaram níveis de vitamina D<sub>3</sub>, 2500/2000 UI / kg ( 1 a 21 dias) e 1250/1000 UI / kg (22 a 40 dias) com ou sem adição de metabólicos 0,5 µg de 11,25 OH<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> e concluíram que, redução em 50% dos níveis de vitamina D<sub>3</sub>, com ou sem a adição de outra fonte de vitamina fornecem a quantidade necessária de vitamina D<sub>3</sub> para um desempenho normal dos frangos.

Ao contrário do observado nesse estudo, melhoria de desempenho produtivo foi relatada por Fritts e Waldroup (2003). Os autores concluíram que a inclusão de 25-OHD3 em dietas de frangos de corte melhorou o peso corporal do que aqueles que receberam vitamina D<sub>3</sub>. Resultados divergentes aos obtidos nesse estudo, também foram encontrados por Santiago et al (2016) que verificaram maior ganho de peso em frangos de corte que receberam suplementação de 25-OHD3 via água (50 mcg/l), no período de 1 a 42 dias. O mecanismo por trás dessa discrepância não é claro, e pode ser devido as diferenças de condições experimentais, a dose de 25-OHD3 utilizadas, condições ambientais e manejo.

Ao avaliaram a resposta em frangos de corte até 21 dias utilizando quatro dietas com vitamina D (200UI/kg); 25-OHD3 (69,0 µg/kg); vitamina D (2000UI/kg) e vitamina D (2000UI/kg) + 25-OHD3 (69,0 µg/kg de ração), Gomez-Verduzco et al. (2013) observaram aumento significativo no ganho de peso, conversão alimentar e resposta imune para as dietas com vitamina D (2000 UI/kg) com e sem 25-OHD3.

Souza et al. (2013) suplementaram níveis de 1,0 a 2,0 µg de vitamina D<sub>3</sub> ativa/kg de ração associada a redução em 20,0 % das exigências de cálcio e fósforo disponível para frangos de corte machos melhorou o desempenho das aves, sendo uma possível alternativa a ser adotada na dieta.

No presente estudo, pressupôs-se que a suplementação de 25-OHD3 resultasse em melhor integridade esquelética capacidade de caminhar. Embora a atividade biológica da 25-OHD3 é estimada em 2 a 2,5 vezes mais ativa que a do

colecalfiferol (LEDWABA; ROBERSON, 2003), a suplementação dietética de 25-OHD3 resultou em correlação positiva entre a densidade mineral óssea e os níveis séricos de 25-OHD3 apenas quando fornecidos de 1 a 46 dias.

A correlação positiva entre os níveis séricos de vitamina D e a densitometria óssea observada apenas para a dieta com suplementação do metabólito 25-OHD3 durante todo o ciclo de produção indica que há um acréscimo na mineralização óssea conforme os níveis séricos de vitamina D3 foram elevados no sangue das aves. Naães et al. (2012) observaram que o metabólito foi eficaz na redução da gravidade da claudicação, reduzindo a discondroplasia tibial e as anormalidades de pernas. Fritts e Waldroup (2003), encontraram maior teor de cinzas ósseas e menor severidade de discondroplasia tibial para as aves alimentadas com 25-OHD3. Esses resultados sugerem que as necessidades suplementares de vitamina D3 podem ser menores com o uso durante todo o período de criação do metabólito 25-OHD3 nas rações. Estudos futuros podem ser desenvolvidos com redução nutricional de Ca e P nas dietas considerando a eficiência desse metabólito.

Resultados semelhantes foram relatados por Vieites et al. (2017) ao avaliarem diferentes níveis da adição de 1,25-dihidroxitamina-D<sub>3</sub> (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 µg ) na dieta de frangos de corte fêmeas aos 35 dias de idade, não sendo observado diferenças nas variáveis métricas, bem como a composição orgânica, índice de seedor e a resistência à quebra dos ossos das aves.

Os efeitos do 25-OHD3 podem variar dependendo da resposta biológica com baixa ou alta eficiência de acordo com a característica avaliada (ABURTO et al., 1998). Nesse sentido, segundo Ledwaba e Roberson (2003) em baixos níveis de cálcio (0,67%) na dieta, o 25-OHD3 (70 mcg/kg) parece ser mais eficaz na redução de incidências de problemas locomotores como a discondroplasia tibial, do que em níveis adequados de cálcio.

Garcia et al., 2013, avaliaram o efeito da vitamina D<sub>3</sub>, 25-OHD3, 1α-OH-D<sub>3</sub> e 1,25-OH<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> na alimentação de frangos de corte e verificaram que os diâmetros, a resistência à quebra, as cinzas, o índice de *Seedor*, os teores de cálcio e de fósforo nos tibiotarsos e nos fêmures das aves, aos sete, 21 e 42 dias, e não observaram diferenças em suas formas, concluindo que haviam fornecido o equivalente ao valor demandado para os animais, desta forma atendendo a demanda fisiológica das aves. Nesse sentido, é possível que o mesmo fato tenha acontecido no presente estudo, ou

seja, os níveis suplementares avaliados não tenham sido suficientes para influenciar o desenvolvimento dos ossos atendendo a demanda fisiológica das aves.

A suplementação de diferentes metabólitos em conjunto com uma fonte de vitamina D é um método de maximizar o desempenho animal, já que fornece uma forma de armazenar a vitamina D a fim de reduzir gastos de energia. É possível que a vitamina D oferecida na ração foi equivalente às necessidades da ave e considerando ainda a falta de desafios sanitários e nutricionais em condições experimentais, a a falta de diferenças significativas observadas entre os metabólitos pode ser justificada. Por outro lado, a suplementação de colecalciferol + 25-hidroxicolecalciferol durante toda a vida produtiva da ave aumentou o nível sérico de 25-OHD3 e apresentou correlação positiva com a densidade mineral óssea, que possibilita maior resistência óssea, permitindo dessa forma o suporte para ganho de massa muscular.

## CONCLUSÃO

A inclusão de 2760 UI de 25-OHD3 nas rações para frangos de corte com níveis adequados de cálcio e fósforo em diferentes períodos de criação, não alterou os parâmetros de desempenho produtivo e *gait score*.

Os níveis séricos de 25-OHD3 associados a vitamina D3 durante toda a vida da ave apresentou correlação positiva com a densitometria óssea, parâmetro relacionado a qualidade óssea. Demais índices ósseos não foram afetados pela suplementação de 25-OHD3 associado a vitamina D<sub>3</sub> nos diferentes programas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS – CAPÍTULO 1

ABREU, V. M. N. **Manejo Inicial e seu Reflexos no Desempenho do Frango**. EMBRAPA, 2009. Disponível em: <[https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/manejo\\_inicial\\_seus\\_reflexos\\_desempenho\\_frango\\_000fz76auer02wx5ok0cpoo6a82zjk9t.pdf](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/manejo_inicial_seus_reflexos_desempenho_frango_000fz76auer02wx5ok0cpoo6a82zjk9t.pdf)> Acesso em: 20 dez 2018.

ABURTO, A.; EDWARDS, J. R.; BRITTON, W. M.; The influence of Vitamin A on the utilization and amelioration of toxicity of cholecalciferol, 25-hydroxycholecalciferol, and 1,25-dihydroxycholecalciferol in young broiler chickens. **Poultry Science**, v. 77, p. 585-593, 1998.

ALMEIDA PAZ, I. C. L. Problemas locomotores e técnicas de mensuração. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2008, Santos. **Anais...** São Paulo, 2008. p. 57-68

ANGEL, R.; SAYLOR, W. W.; MITCHELL, A. D. Effect of dietary phosphorus, phytase and 25-hydroxycholecalciferol on broiler chicken bone mineralization litter phosphorus, and processing yields. **Poultry Science**, v. 85, p.1200-1211, 2006.

BAR, A.; SHARVIT, M.; NOFF, D.; EDELSTEIN, S.; HURWITZ, S. Absorption and excretion of cholecalciferol and of 25-hydroxycholecalciferol and metabolites in birds. **The Journal of Nutrition**, v. 110, p.1930–1934, 1980.

BOZKURT, M.; YALÇIN, S.; KOÇER, B.; TÜZÜN, A. E.; AKŞIT, H.; ÖZKAN, S.; UYGUN, M.; EGE, G.; GÜVEN, G.; YILDIZ, O. Effects of enhancing vitamin D status by 25-hydroxycholecalciferol supplementation, alone or in combination with calcium and phosphorus, on sternum mineralisation and breast meat quality in broilers. **British Poultry Science**, 2017.

BROWNING, L. C.; COWIESON, A. J. Effect of vitamin D- 3 and strontium on performance, nutrient retention, and bone mineral composition in broiler chickens. **Animal Production Science**. v. 54, p. 942–949, 2015.

CASTRO F. L. S.; BAIÃO, N.C.; ECCO, R.; JEFFERSON, M.; LOUZADA, Q.; MELO, E.F.; SALDANHA, M.M.; M. V. TRIGINELLI, M.V.; LARA, L.J.C. Effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol and reduced vitamin D3 level on broiler performance and bone quality. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 47:e 20170186, 2018.

CHOU, S. H.; CHUNG, T. K.; YU, B. Effects of supplemental 25-hydroxycholecalciferol on growth performance, small intestinal morphology, and immune response of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 88, p. 2333-2341, 2009.

COLET, S.; GARCIA, R.G.; ALMEIDAPAZ, I.C.L.; CALDARA, F.R.; BORILLE, R.; ROYER, A.F.B.; NAAS, I.A. and SGAVIOLI, S. Bone characteristics of broilers supplemented with vitamin D. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. vol. 17: 325-332. 2015

FRITTS, C.A.; WALDROUP, P.W. Effect of source and level of vitamin D on live performance and bone development in growing broilers. **Journal Applied Poultry Research**, v.12, p. 45-52, 2003.



GARCIA, A. F. Q. M.; MURAKAMI, A. E.; AMARAL DUARTE, C. R.; ROJAS, I. C. O. R.; PICOLI, K. P.; PUZOTTI, M. M. Use of vitamin D3 and its matabolites in broiler chicken feed on performance, bone parameters and meat quality. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 26, p. 408-415, 2013.

GÓMEZ-VERDUZCO, G.; MORALES-LÓPEZ, R. AND AVILA-GOZÁLEZ, E. Use of 25-hydroxycholecalciferol in diets of broiler chickens: effects on growth performance, immunity and boné calcification. **Journal Poultry Science**, v. 50, p. 60-64, 2013.

HAN, J.C.; CHEN, G.; WANG, J.; ZHANG, J.; QU, H.X.; ZHANG, C.; YAN, Y.; CHENG, Y.H. Evaluation of relative bioavailability of 25-hydroxycholecalciferol to cholecalciferol for broiler chickens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 29, p. 1145-1151, 2016.

KAPELL, D. N. R. G.; HILL, W. G.; NEETESON, A.-M.; MCADAM, J.; KOERHUIS, A. N. M.; AVENDANO, S. Twenty-five years of selection for improved leg health in purebred broiler lines and underlying genetic parameters. **Poultry Science**. v. 91, p. 3032–3043, 2012.

KORELESKI, J.; SWIATKIEWICZ, S. Efficacy of different limestone particle size and 25-hydroxycholecalciferol in broiler diets. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 14, p. 705-714, 2005.

LEDWABA, M. F.; ROBERSON, K. D. Effectiveness of twenty-five-hydroxycholecalciferol in the prevention of tibial dyscondroplasia in Ross cockerels dependo n dietary calcium level. **Poultry Science**. v. 82, p. 1769-1777, 2003.

MURAKAMI, A.E.; GARCIA, E.R.M.; MARTINS, E.N.; MOREIRA, I.; SCAPINELLO, C.; OLVEIRA, A.F.G. Efeito da inclusão de óleo de linhaça nas rações sobre o desempenho e os parâmetros ósseos de frangos de corte. **Revistra Brasileira de Zootecnia**. Viçosa- MG. vol. 38, nº7, 2009.

MICHALCZUK, M.; PIETRZAK, D.; NIEMIEC, J.; MROCZEK, J. Effectiveness of vitamin D3 and calcidiol (25-OHD3) application in feeding broiler chickens-production performance and meat quality. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 60, p. 121-126, 2010.

MORRIS, A.; SHANMUGASUNDARAM, R.; LILBURN, M. S.; SELVARAJ, R. K. 25-Hydroxycholecalciferol supplementation improves growth performance and decreases inflammation during an experimental lipopolysaccharide injection. **Poultry Science**, v. 93, p.1951-1956, 2014.

NÄÄS, I. A.; BARACHO, M. S.; BUENO, L. G. F.; MOURA, D. J.; VERCELINO, R. A.; SALGADO, D. D. Use of vitamin D to reduce lameness in broilers reared in harsh environments. **Revista Brasileira Ciencia Avicola**, v. 14, p. 159-232, 2012.

RAO, S. V. R.; RAJU, M. V. L. N.; PANDA, A. K. Effect of high concentrations of cholecalciferol on growth, bone mineralization and mineral retetion in broiler chicks fed

suboptimal concentrations of calcium and nonphytate phosphorus. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 15, p. 493-501, 2008.

RAO, S. V. R.; RAJU, M. V. L. N.; PANDA, A. K.; SUNDER, G. S.; SHARMA, R. P. Effect of high concentrations of cholecalciferol on growth, bone mineralization, and mineral retention in broiler chicks fed suboptimal concentrations of calcium and nonphytate phosphorus. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 15, p. 493-501, 2006.

RATH, N. C.; HUFF, G. R.; BALOG, J. M. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. **Poultry Science**, v. 79, n. 7, p. 1024-1032, 2000.

RATH, N. C.; KANNAN, L.; PILLAI, P. B.; HUFF, W. E.; HUFF, G. R.; HORST, R. L.; EMMERT, J. L. Evaluation of the efficacy of vitamin D3 or its metabolites on thiram-induced tibial dyschondroplasia in chickens. **Research in Veterinary Science**, v.83, p. 244-250. 2007.

SAKOMURA, N. K; ROSTAGNO, H.S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos**. Jaboticabal: Funep, p.283, 2007.

SANTIAGO, M.; DAVID, S.; ALEXANDRA, N.; et al. Effect of 25hydroxycholecalciferol (25-OHD3) on productive performance and bone mineralization in broiler. **Open Journal of Animal Sciences**. v.6, p.180-184, 2016.

SCHMIDT, C. J.; PERSIA, M. E.; FEIERSTEIN, E.; KINGHAM, B.; SAYLOR, W. W. Comparison of a modern broiler line and a heritage line unselected since the 1959s. **Poultry Science**, v. 88, p. 2610-2619, 2009.

SEEDOR, J.G. The biophosphonate alendronate (MK-217) inhibit bone loss due to ovariectomy in rats. **Journal Bone and Mineral Research**, v. 4, p. 265-270, 1995.

SIEGEL, P. B. Evolution of the modern broiler and feed efficiency. **Annual Review of Animal Biosciences**, v, 2, p. 375–385, 2014.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. p.235. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, 2002.

SOUZA, C.S.; VIEITES, F.M.; VASCONCELLOS, C.H.F.; CALDERANO, A.A.; NUNES, R.V.; FERREIRA, C.M.; PEREIRA, T.V.S. E MORAES, G.H.K. Suplemento de 1,25 dihidroxicolecalciferol e redução de cálcio e fósforo disponível para frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 65: 519-525, 2013.

VIEITES, F.M.; DROSGHIC, L.C.A.B.; SOUZA, C.S.; LIMA, C.A.R.; MORAES, G.H.K.; NUNES, R.V.; VASCONCELLOS, C.H.F.; VARGAS JÚNIOR, J.G. 1,25-dihidroxitamina-D3 sobre as características ósseas de frangos de corte fêmeas **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.69, n.5, p.1285-1293, 2017.

WHITEHEAD, C. C.; MCCORMACK, H. A.; MCTEIR, L.; FLEMING, R. H. High vitamin D3 requirements in broilers for bone quality and prevention of tibial dyschondroplasia and interactions with dietary calcium, available phosphorus and vitamin A. **Brasilian Poultry Science**, v.45, p.425–436, 2004.

WIDEMAN, R. F.; BLANKENSHIP, J.; PEVZNER, I. Y.; TURNER, B. J. Efficacy of 25-OH vitamin D3 prophylactic administration for reducing lameness in broilers grown on wire flooring. **Poultry Science**, v. 94, p. 1821-1827, 2015.

WILLIAMS, B.; WADDINGTON, D.; MURRAY, D. H.; FARQUHARSON, C. Bone strength during growth: influence of growth rate on cortical porosity and mineralization. **Calcified Tissue International**, v. 74, p. 236– 245, 2004.

YARGER, J. G.; SAUNDERS, C. A.; MCNAUGHTON, J. L.; QUARLES, C. L.; HOLLIS, B. W.; GRAY, R. W. Comparison of dietary 25-hydroxycholecalciferol and cholecalciferol in broiler chickens. **Poultry Science**. v. 74, p. 1159–1167, 1995.

## **CAPÍTULO 2: SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE 25-HIDROXICOLECALCIFEROL (25-OHD3) EM DIFERENTES FASES DE CRIAÇÃO SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DO mTOR, RENDIMENTO E QUALIDADE DE CARNE E OCORRÊNCIA DE WOODEN BREAST DE FRANGOS DE CORTE**

**RESUMO:** O experimento teve por objetivo avaliar a inclusão de 25-hidroxicolecalciferol (25-OHD3) em dietas iniciais, de crescimento ou abate suplementadas com vitamina D<sub>3</sub> sobre o rendimento de carcaça, qualidade de carne e redução de miopatias de frangos de corte de 1 a 46 dias de idade. Para isso, foram utilizados 1584 pintos de corte Ross®, machos. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos de 9 repetições com 44 aves cada (12,5 aves/m<sup>2</sup>). Os níveis de suplementação de vitamina D foram fornecidas em concentrações iguais (3,000 UI/kg de ração) em todas as dietas. A dieta controle (DC) continha 3,000 UI D<sub>3</sub> por kg de ração, oferecida no período de 1 a 46 dias, enquanto as dietas experimentais continham 3000 UI D<sub>3</sub> + 2760 UI de 25-OHD3 por kg de ração, oferecidas em três programas de alimentação: 1 a 21, 1 a 35 e 1 a 46 dias. Foi observado efeito quadrático ( $p < 0,05$ ) crescente da inclusão de 25-OHD3 a partir da suplementação de 1 a 21 dias sobre os níveis séricos de 25-OHD3, expressão gênica da proteína mTOR e teor de proteína no peito. Enquanto o rendimento do peito aumentou linearmente ( $p < 0,05$ ) de acordo com o período de suplementação. As aves suplementadas com 25-OHD3 por 46 dias apresentaram concentrações circulantes de 25-OHD3 significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) em comparação com a dieta controle e com as suplementações de 21 e 35 dias. Os níveis séricos 25-OHD3 avaliados possuem correlação positiva ( $r = 0,58$ ) com a expressão da via mTOR, que por sua vez, resulta em estimulação da síntese proteica no peito das aves. A avaliação histológica do peito mostrou diminuição ( $p < 0,05$ ) da incorporação de colágeno e gordura nas fibras musculares de acordo com o período de suplementação de 25-OHD3. A suplementação de 25-OHD3 associado a vitamina D<sub>3</sub> durante toda a vida produtiva das aves contribuiu para o aumento dos níveis séricos de vitamina D e expressão da via mTOR, mostrando-se como uma estratégia para aumentar a deposição de proteína e rendimento de peito, apesar de não resultar em benefícios sobre a qualidade da carne.

**Palavras-chave:** Síntese proteica. Miopatia. mTOR. Rendimento de peito.

## CHAPTER 2: DIETARY SUPPLEMENTATION OF 25-HYDROXYCOLECALCIFEROL (25-OHD3) IN DIFFERENT CREATION PHASES ON THE GENERAL EXPRESSION OF mTOR, YIELD AND QUALITY OF MEAT AND WOODEN BREAST OCCURRENCE OF BROILERS

**ABSTRACT:** The objective of the experiment was to evaluate the inclusion of 25-hydroxycholecalciferol (25-OHD3) in initial, growth or slaughter diets supplemented with vitamin D3 on carcass yield, meat quality and reduction of myopathy of broiler chickens from 1 to 46 days of age. For this, 1584 Ross® male broilers were used. The experimental design was completely randomized with 4 treatments of 9 replicates with 44 birds each (12.5 birds / m<sup>2</sup>). Vitamin D supplementation levels were provided at equal concentrations (3,000 IU / kg of feed) in all diets. The control diet (DC) contained 3,000 IU D3 per kg of feed, offered in the period from 1 to 46 days, while the experimental diets contained 3000 IU D3 + 2760 IU of 25-OHD3 per kg of feed, offered in three programs of feed: 1 to 21, 1 to 35 and 1 to 46 days. Increasing quadratic ( $p < 0.05$ ) effect of 25-OHD3 inclusion from 1 to 21 day supplementation on serum levels of 25-OHD3, gene expression of mTOR protein, and protein content in chest. While the breast yield increased linearly ( $p < 0.05$ ) according to the period of supplementation. The birds supplemented with 25-OHD3 for 46 days had significantly higher circulating concentrations of 25-OHD3 ( $p < 0.05$ ) compared to the control diet and supplements of 21 and 35 days. The serum 25-OHD3 levels were positively correlated ( $r = 0.58$ ) with expression of the mTOR pathway, which in turn resulted in stimulation of protein synthesis in the breast of the birds. Histological evaluation of the chest showed a decrease ( $p < 0.05$ ) in the incorporation of collagen and fat in muscle fibers according to the 25-OHD3 supplementation period. Vitamin D3 supplementation of 25-OHD3 throughout the productive life of the birds contributed to the increase in serum vitamin D levels and expression of the mTOR pathway, proving to be a strategy to increase protein deposition and yield breast, although it does not result in benefits on the quality of the meat.

**Key words:** Protein synthesis. Myopathy. mTOR. Breast yield.

## INTRODUÇÃO

Diante da alta demanda de produtos cárneos, o setor avícola mundial, principalmente, o mercado de carne de frango está em crescente expansão. A seleção genética trouxe melhorias significativas para o frango de corte moderno como as elevadas taxas de crescimento e peso corporal (TICKLE et al., 2014). A mudança mais visível desta seleção é o maior percentual de músculo (BOZKUT et al., 2017). Em comparação com as variedades ancestrais, a hipertrofia peitoral no frango de corte dobrou o tamanho do músculo, tornando até 20% da massa corporal total na ave moderna (HAVENSTEIN et al., 2003; SCHMIDT et al., 2009; TICKLE et al., 2014).

Com isso, a incidência de miopatias no músculo do peito tem aumentado com o crescimento animal (VELLEMAN, 2015). Miopatias como *wooden breast* (MUDALAL et al., 2015; VELLEMAN; CLARK, 2015), *white striping* (KUTTAPPAN et al., 2013; PETRACI et al., 2013), miopatia peitoral profunda (KIJOWSKI; KONSTANCZAK, 2009), carne pse (pálida, macia e exudativa (WOELFEL et al., 2002) são alguns dos problemas enfrentados pela indústria da carne. Além de reduzir a qualidade de carne, impactam negativamente na capacidade de retenção de água, nas propriedades texturais e na aparência (CLARK; VELLEMAN, 2017).

Há, portanto, uma constante necessidade de identificar estratégias, afim de melhorar o desempenho produtivo, o rendimento e qualidade de carcaça, reduzir custos e otimizar a produção (VIGNALE et al., 2015). Na nutrição de aves, estudos sobre diferentes nutrientes, incluindo minerais e vitaminas, têm mostrado forte correlação entre nutrição e saúde (CHOU et al., 2009; GOMEZ-VERDUZCO et al. 2013).

O colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>) é uma fonte comercial comum da vitamina D na alimentação de aves. A vitamina D é absorvida no intestino e metabolizada em hidroxilações sequenciais, a primeira ocorre no fígado para formar o 25-hidroxicolecalciferol (25-OHD<sub>3</sub>) e depois no rim, para formar o 25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> e 1, 25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> (BERRI et al., 2007; VIGNALE et al., 2015). Dessa forma, a principal forma circulante da vitamina D<sub>3</sub> é o 25-hidroxicolecalciferol.

Desde sua comercialização, o uso do metabólito 25-OHD<sub>3</sub> tem sido recomendado na indústria avícola na forma de suplementação dietética como fonte de vitamina D, visando melhorias no desempenho produtivo e a integridade óssea de

frangos de corte (YARGER et al., 1995; BAR et al., 2003; FRITTS; WALDROUP, 2003).

Entretanto, estudos recentes tem mostrado a participação da 25-OHD3 em importantes rotas metabólicas ligadas, principalmente, ao crescimento e desenvolvimento muscular de frangos de corte por meio da modulação da sinalização celular e da transcrição de genes (MICHALCZUK et al., 2010; BERRI et al., 2007; HUTTON et al., 2014). VIGNALE et al. (2015), comprovaram que a suplementação dietética com 25-OHD3 estimula a síntese protéica através de um aumento nas taxas de iniciação traducional, processo que envolve diversos fatores de iniciação, quinases e fosfatases, cujas atividades são reguladas por fosforilação. Esta ativação ocorre por vias de sinalização dependentes da proteína quinase mTOR (mechanistic Target of Rapamycin - mTOR).

O mTOR ativado pode fosforilar o fator de iniciação de tradução eucariótica 4E-binding proteína 1 (4EBP1), que leva à liberação da tradução fator de iniciação 4E (eIF4E). A disponibilidade de eIF4E é o fator limitante para o início da tradução, forma um complexo com outros fatores de iniciação (eIF4F, eIF4G e eIF4A) e regula a ligação de mRNA ao ribossomo. Entretanto, mTOR também pode fosforilar proteína ribossômica S6 quinase 1 (S6K1), que ativa S6, uma proteína que promove a iniciação da tradução (CHEN ET AL., 2016). Entretanto, a literatura é limitada sobre o efeito da vitamina D sobre esse aspecto.

Desta forma, objetivo do estudo foi investigar o efeito da inclusão de 25-OHD3 em dietas iniciais, de crescimento e abate suplementadas com vitamina D<sub>3</sub> sobre o rendimento de carcaça, qualidade de carne, miopatias e crescimento e desenvolvimento muscular de frangos de corte por meio do aumento na expressão do marcador de inicialização de síntese proteica mTOR.

## MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor Palotina da Universidade Federal do Paraná – UFPR, sob o protocolo número 51/2014.

Aves e Delineamento experimental:



O experimento foi realizado no aviário experimental da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina. Foram utilizados 1584 pintos de corte machos, de um dia, da linhagem Ross® Ap95, distribuídos de acordo com um delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 9 repetições cada, totalizando 36 unidades experimentais (Tabela 1).

A vitamina D foi fornecida em concentrações iguais (3.000 UI/kg de ração) como vitamina D<sub>3</sub> em todas as dietas. A dieta controle (DC) continha 3.000 UI D<sub>3</sub> por kg de ração, enquanto as dietas experimentais continham 3000 UI D<sub>3</sub> + 2.760 UI de 25-OHD<sub>3</sub> por kg de ração.

TABELA 1 - TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS

Tratamentos	Vitamina D (UI/kg)	25-OHD <sub>3</sub> * (UI/kg)	Total Atividade vitamina D	Período (dias)
T1	3.000	-	3.000	1 - 46
T2	3.000	2.760	5.760	1 - 21
	3.000	-	3.000	22 - 46
T3	3.000	2.760	5.760	1 - 35
	3.000	-	3.000	36 - 46
T4	3.000	2.760	5.760	1 - 46

\* 1 micrograma de colicalciferol = 40 UI.

Dietas experimentais:

As rações experimentais foram formuladas à base de milho e farelo de soja, em programa de alimentação com três fases: inicial (1 a 21 dias), crescimento (22 a 35 dias) e abate (36 a 46 dias) na forma farelada. Para cada fase formulou-se rações seguindo as recomendações nutricionais praticadas pelas integrações avícolas da região de acordo com o resultado bromatológicos dos ingredientes (Tabela 2). As rações foram fornecidas *ad libitum* na forma farelada e coletadas amostras para verificação dos níveis formulados (Tabela 3).

As concentrações de vitamina D utilizada nas dietas experimentais foram com base nas diretrizes de Suplementação de Vitaminas da DSM (ROVIMIX Hy-D; DSM Nutritional Products, Basel, Switzerland) para frangos de corte (DSM, 2012). O metabólito da vitamina D<sub>3</sub>, 25-OHD<sub>3</sub>, foi adicionado via premix, sendo avaliada sua recuperação nas rações, conforme Tabela 4.



TABELA 2 - COMPOSIÇÃO E NÍVEIS NUTRICIONAIS DAS RAÇÕES NAS FASES INICIAL (1 A 21 DIAS), CRESCIMENTO (22 A 35 DIAS) E ABATE (36 A 46 DIAS) DE FRANGOS DE CORTE.

Ingredientes, kg	Inicial	Creascimento	Abate
Milho <sup>1</sup>	601,77	638,48	690,56
Óleo de Soja	21,00	35,00	36,00
Farelo de soja <sup>1</sup>	309,00	268,0	223,00
Farinha de carne <sup>1</sup>	45,00	36,00	29,00
Sal	2,00	1,90	2,00
Calcário	5,80	5,60	5,60
Bicarbonato Sódio	2,90	2,70	2,40
DL-Metionina 98%	3,69	3,52	3,20
Biolys 50.7	2,920	3,20	3,22
Treonina 98% Pó	0,990	1,000	0,820
L-Valine 96.5	0,464	0,705	0,602
Colina 60% Pó	0,960	0,740	0,600
Salinomicina 12% <sup>2</sup>	-	0,550	-
Nicarbazina+Narasina 80/80 <sup>2</sup>	0,500	-	-
Premix vitamínico <sup>3</sup> e mineral <sup>4</sup>	3,000	3,000	3,000
Composição nutricional			
PB, %	22,00	20,00	18,00
EM, Kcal/kg	3050	3180	3250
GB, %	5,233	6,555	6,698
FB, %	2,359	2,210	2,061
Cálcio, %	0,950	0,840	0,760
P Disp., %	0,470	0,420	0,380
Lis Dig., %	1,256	1,160	1,040
AAS Dig., %	0,967	0,906	0,832
Thr Dig., %	0,829	0,767	0,687
Trp Dig., %	0,229	0,205	0,179
Val Dig., %	0,954	0,894	0,801
Na, %	0,200	0,190	0,180
Cl, %	0,240	0,240	0,240

<sup>1</sup>Milho: proteína bruta 7,5%; extrato etéreo 4,3%; fibra bruta 1,18%; umidade 12,5%; Farelo de soja: : proteína bruta 46,7% ;extrato etéreo 1,29% ;fibra bruta 4,9% ; uréase 0,01; proteína solúvel 80%; Farinha de carne: proteína bruta 48,5%; cálcio 11,59%; fosforo 5,27%;

<sup>2</sup>Anticoccidiano

<sup>3</sup>Premix vitamínico: Vit. A 9,000,000 UI/kg; Vit. D3 2,500,000 UI/kg; Vit. E 20,000 UI/kg; Vit. K3 2,500 mg/kg; Vit. B1 2,000 mg/kg; Vit. B2 6,000 mg/kg; Acido Pantotenico 12 g/kg; Vit. B6 3,000 mg/kg; Vit. B12 15,000 mcg/kg; Niancina 35 g/kg; Acido folico 1,500 mg/kg; Biotina 100 mg/kg; Selenio 250 mg por kg de premix.

<sup>4</sup>Premix mineral : Ferro100 g/kg; Cobre 20 g/kg; Manganes 130 g/kg; Cobalto 2,000 mg/kg; Zinco 130 mg/kg; Iodo 2,000 mg por kg de premix.

\*Premix tratamento suplementado com 69 mcg/kg de Rovimix HyD (25-OHD3).

TABELA 3. RESULTADOS BROMATOLÓGICO DAS RAÇÕES EXPERIMENTAIS

Fase/ Tratamento	Proteína Bruta (%)	Gordura (%)	Cinzas (%)	Fibra (%)	Cálcio (%)	Fósforo (%)
Ração Inicial T1	22,74	4,71	5,08	2,47	0,95	0,60
Ração Inicial T1/T2/T3	22,61	4,55	4,58	2,35	0,96	0,60
Ração Crescimento T1/T2	20,19	5,61	4,5	2,46	0,85	0,54
Ração Crescimento T3/T4	20,29	5,92	4,79	2,37	0,85	0,53
Ração Abate T1/T2/T3	18,91	5,42	4,44	2,66	0,78	0,49
Ração Abate T4	18,91	5,32	4,38	2,57	0,78	0,49

TABELA 4. RECUPERAÇÃO DO METABÓLITO 25-HIDROXICOLECALCIFEROL ADICIONADO NAS DIETAS EXPERIMENTAIS.

Fase/ Tratamento	25-OHD3
Ração Inicial T1	< limite de detecção
Ração Inicial T1/T2/T3	67,9 ug/kg
Ração Crescimento T1/T2	< limite de detecção
Ração Crescimento T3/T4	63,4 ug/kg
Ração Abate T1/T2/T3	< limite de detecção
Ração Abate T4	63,6 ug/kg

#### Instalações e manejo das aves:

As aves foram vacinadas no incubatório contra doença de marek, gumboro e bronquite infecciosa e alojadas em galpão experimental equipados com exaustores e placas de resfriamento controlados por um sistema automatizado durante o período de 1 a 46 dias de idade. Os boxes experimentais tinham dimensão de 1,50 x 2,50 (3,75 m<sup>2</sup>) com 44 aves cada (12,5 aves/m<sup>2</sup>), sobre cama de maravalha reutilizada (4º lote). Água e ração foram fornecidos à vontade. A temperatura foi monitorada diariamente e mantida dentro da faixa de conforto térmico para atender às recomendações da Aviagen (2014). As aves receberam 24 horas de luz até os 14 dias, em função do sistema de aquecimento (lâmpada halógena de 300W), após esse período 16 horas de luz e 8 de escuro. Foi realizado manejo de cama dos 14 aos 28 dias com reviramento em dias intercalados.

#### Nível sérico de 25-OHD3:

A determinação dos índices séricos de 25-OHD3 foi realizado aos 21, 35 e 46 dias de idade, em amostras de sangue de duas aves por unidade experimental (18 aves/tratamento). As amostras, obtidas por punção venosa da veia braquial, foram acondicionadas em tubos de ensaio com anticoagulante imediatamente centrifugadas a 9000 rpm durante 60 segundos; o plasma foi armazenado a -80oC. A concentração

plasmática de 25-OHD3 foi realizada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS), conforme metodologia descrita por Weber et al. (2014).

#### Rendimento de carcaça e cortes comerciais:

O rendimento de carcaça e cortes foi determinado aos 46 dias de idade, para tal, foram selecionadas 108 aves por tratamento, totalizando 432 aves. Após jejum alimentar de seis horas, os frangos foram insensibilizados por eletrochoque e abatidos por sangria mediante corte da veia jugular, sendo posteriormente escaldados, depenados e eviscerados, de acordo com a Instrução Normativa nº 3 de janeiro de 2000 (Regulamento Técnico de Métodos de Insensibilização para o Abate Humanitário de Animais de Açougue).

Para o cálculo de rendimento de carcaça foi considerado o peso da carcaça eviscerada quente, sem os pés, cabeça e gordura abdominal, expresso em relação ao peso vivo, obtido individualmente antes do abate das aves. Para o rendimento dos cortes nobres, foi considerado o rendimento do peito inteiro com pele e ossos, das pernas (coxa e sobrecoxa com ossos e pele), dorso e asas com pele que foi expresso em relação ao peso da carcaça eviscerada.

O peito inteiro de cada ave foi desossado para a determinação do rendimento de carne de peito total, filé sem pele e sem osso e *sassami*. O corte de asa, medalhão e cartilagem foram determinados por pesagem e posteriormente obtidos seus respectivos percentuais em relação ao peso da carcaça. A gordura abdominal presente ao redor da cloaca, da bolsa cloacal, moela, pró-ventrículo e dos músculos abdominais adjacentes foi retirada, em seguida, foi pesada e calculada em relação ao peso da carcaça eviscerada.

#### Score de *Wooden Breast* – avaliação macroscópica:

Para avaliação da lesão de *Wooden Breast* foram utilizados 108 peitos desossados por tratamento. Os peitos de todas as aves abatidas foram classificados em aceitável pela indústria (peitos que apresentavam estrias pouco visíveis lesões leves, sem dureza ou áreas pálidas ou levemente afetado nas áreas craniais e caudais) e não aceitável (estrias esbranquiçadas, com hemorragia superficial e presença de exsudato estéril na superfície muscular), que são descartados pela linha

de inspeção sanitária. Utilizou-se a metodologia de KUTTAPPAN et al. (2017), a qual foi modificada para os critérios utilizados pela indústria.

#### Avaliação da ocorrência de miopatia:

Foram retiradas amostras do músculo *Pectoralis Major* de 6 aves/repetição (54 aves/tratamento), as quais foram fixadas e parafinadas. Os cortes foram orientados longitudinalmente, com oito micras de espessura e submetidos à coloração de Tricrômico de Masson (Código EP-11-20013, Easypath®, Erviegas) As imagens foram capturas por meio de câmera digital de alta resolução PRO SERIES da Mídia Cibertecnics, acoplada ao microscópio Olympus Bx 40, em aumento de 4 vezes. Para a leitura das imagens, foi utilizado um analisador de imagem computadorizado IMAGE PROPLUS 5.2 (Mídia Cibertecnics) com o objetivo de mensurar a proliferação de tecido conjuntivo (colágeno) e gordura entremeando os feixes musculares em relação a área total do corte capturado. Para tal, atribuiu-se uma cor para a estrutura mensurada a fim de estabelecer o contraste entre as demais estruturas e o cálculo do percentual de gordura, tecido conjuntivo e proteína muscular em relação a área total capturada, conforme metodologia descrita por Vissotto, 2016.

#### Qualidade de carne:

As análises de qualidade de carne do peito foram realizadas 24 horas *post-mortem* no músculo peitoral maior (*Pectoralis major*) e no *sassami* (*Pectoralis mijor*) de 54 aves por tratamento.

A determinação da perda de água por gotejamento (*drip loss*) foi determinada de acordo a metodologia proposta por Boccard et al. (1981). As amostras do músculo *Pectoralis minor* direito (*sassami*) foram pesadas e colocadas em sacos de polietileno e posteriormente suspensas em ganchos de aço galvanizado mantidos sob refrigeração por 48 horas. A porcentagem de perda de água por gotejamento foi obtida por meio da diferença entre o peso inicial e o peso final da amostra, dividido pelo peso inicial e multiplicado por 100.

A perda de água por pressão foi realizada utilizando amostras de cerca de dois gramas da porção cranial do músculo *Pectoralis major* esquerdo (filé do peito). As amostras foram posicionadas entre dois papéis filtro e pressionadas por duas placas de acrílico com um peso de 10 kg por cinco minutos. Após a prensagem as

amostras foram novamente pesadas para obtenção do percentual de perda de água por pressão (BRIDI; SILVA, 2009).

A porção caudal do músculo *Pectoralis major* esquerdo foi utilizada para a realização do teste de perda de água por congelamento. As amostras foram pesadas, congeladas por 24 horas, descongeladas e pesadas (BRIDI; SILVA, 2009).

Para determinação da perda de água por cocção as amostras de porções medianas do *Pectoralis major* esquerdo foram colocadas em sacos de polietileno e cozidas em banho-maria por 60 minutos a 180°C. Após a cocção, as amostras foram refrigeradas por 24 horas e posteriormente pesadas, por meio da diferença do peso inicial (in natura) e final (peito cozido), calculou-se a perda de peso por cozimento de acordo com a metodologia modificada de Silva Sobrinho (1999).

Para avaliação da força de cisalhamento, utilizou-se texturômetro (Modelo TA-XT2i, Stable Mycro Systems LTDA., Goldalming, UK) equipado com dispositivo Warner-Bratzler. Foram retiradas de cada amostra do músculo *Pectoralis major* esquerdo cozido, seis sub-amostras cilíndricas de 2,5 cm de comprimento e 1,27 cm de diâmetro, utilizando-se um amostrador de aço de forma cilíndrica. A força de cisalhamento foi medida perpendicularmente à orientação das fibras musculares com a lâmina adaptada ao texturômetro (WHIPPLE et al., 1990), com velocidade do dispositivo de 5mm/s no pré e pós-teste e de 2mm/s no teste.

#### Avaliação de deposição de proteína

Os mesmos peitos utilizados na análise de qualidade de carne foram avaliados quanto a composição de proteína. O músculo *Pectoralis major* direito (filé do peito) foi moído individualmente em um moedor de carne (ECCEL-MCIE98) e após homogeneização foram retiradas amostras para secagem em estufa a 55°C por 72 horas. Após a secagem, as amostras foram finalmente trituradas em moinho tipo faca para análise de teor de proteína (nitrogênio multiplicado pelo fator 6,25), pelo método de Kjeldahl, através de digestão ácida, seguida de destilação e titulação.

#### Biomarcador de metabolismo muscular:

Para avaliação da expressão genica muscular foi utilizada a metodologia proposta por Rojas (2015). Para isso foram coletados seis fragmentos da porção cranial do musculo do peito por tratamento, armazenados em nitrogênio liquido, e encaminhados para a análise da proteína mTOR. Para isso o RNA total foi extraído

com uso do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), na proporção de 1mL para cada 100 mg de tecido, sendo homogeneizados utilizando-se homogeneizador Polytron (tecido + Trizol) até a completa dissociação. O pelet foi ressuspensionado em água ultrapura livre de RNase. A concentração total, qualidade e integridade do RNA foi determinada utilizando-se espectrofotômetro (NanoDrop ND 1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

Para confecção do cDNA, foi utilizado o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis Super Mix e Oligo d(T) (Invitrogen Corporation, Brasil), e RNase out (Invitrogen Corporation, Brasil) para degradação de mRNA, de acordo com as normas do fabricante. Para as reações de PCR em tempo real, foi utilizado o corante fluorescente SYBR GREEN (SYBR® GREEN PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA). As análises de PCR em tempo real foram realizadas no termociclador iQ5™ Bio-Rad (Bio-Rad Laboratórios, Hercules, CA), utilizando-se os seguintes parâmetros de ciclo: 95°C por 10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 seg e anelamento por 1 min em diferentes temperaturas e curva de Melting a 55°C por 30 seg para avaliar a especificidade de cada produto da PCR. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para ampliação dos genes alvos (mTOR, S6K1, 4E-BP1 e eEF2) foram baseados nas sequências de nucleotídeos utilizados por Lee et al. (2012) de acordo com as sequências de frangos (nº de acesso GenBank - XM\_417614, XM\_415882, XM\_424384, NM\_205368 e XM\_416323, respectivamente).

#### Análise estatística:

Os dados foram submetidos à análise de variância (PROC GLM) em relação aos tratamentos e, quando este efeito foi significativo ( $P < 0,05$ ), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (PROC MEANS). Procedeu-se, também, a análise de regressão (PROC REG) até segunda ordem (quadrática), considerando o período de suplementação da vitamina D. Para a análise de wooden breasts os dados foram submetidos ao teste de normalidade (PROC UNIVARIATE), que indicou que as variáveis não apresentaram distribuição normal. Portanto, procedeu-se a análise não paramétrica dos dados em relação aos tratamentos pelo teste de Kruskal-Wallis (PROC NPAR1WAY). Realizou-se também a análise de correlação simples de Pearson (PROC CORR) entre os níveis séricos de vitamina D<sub>3</sub> (25-OHD<sub>3</sub>) aos 46 dias de idade e a expressão do gene mTOR. Adotou-se o nível de significância de 5%. As análises foram realizadas no programa *Statistical Analysis System* (SAS), versão 9.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de rendimento de carcaça e cortes estão apresentados na Tabela 5. Houve diferença significativa para o rendimento de carcaça ( $p < 0,04$ ) apenas entre a dieta com suplementação de 25-OHD3 fornecida no período de 1 a 35 dias e a de 1 a 46 dias, sendo que maior rendimento foi observado no período de 1 a 46 dias, embora não significativamente diferente da dieta controle e da suplementação de 25-OHD3 de 1 a 21 dias. Para o rendimento do peito (filé + sassami), a suplementação de 25-OHD3 fornecida no período de 1 a 46 dias resultou em maior rendimento de peito, embora não significativamente diferente da dieta controle e da suplementação de 25-OHD3 de 1 a 35 dias. Na análise de regressão, observou-se efeito linear ( $p < 0,05$ ) para o rendimento do peito em função do período de suplementação de 25-OHD3. De acordo com a equação de regressão ( $\hat{Y} = 23,6607 + 6,1247x$ ), a suplementação no período total de criação (46 dias) resultou no maior rendimento de peito dos frangos de corte (Figura 1). As demais características de carcaça não foram influenciadas ( $p > 0,05$ ) pelo período de suplementação de 25-OHD3.

TABELA 5 – RENDIMENTO DE CARÇAÇA E CORTES COMERCIAIS E DEPOSIÇÃO DE GORDURA ABDOMINAL DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D<sub>3</sub> E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE.

Características	Vit D (UI/kg) <sup>1</sup>	25-OHD3 (mcg/kg) <sup>2</sup>	25-OHD3 (mcg/kg) <sup>3</sup>	25-OHD3 (mcg/kg) <sup>4</sup>	CV,  %	P-valor	Regressão
	1 a 21 dias		1 a 35 dias	1 a 46 dias			
Carçaça, %	80,59 ab	80,66 ab	80,23 b	81,10 a	2,76	0,0409	NS
Peito (filé + sassami), %	29,91 ab	29,72 b	30,17 ab	30,46 a	6,59	0,0383	LINEAR
Filé, %	24,72	24,72	25,06	25,24	7,12	0,0803	NS
Sassami, %	5,19	5,05	5,12	5,22	10,21	0,0715	NS
Pernas, %	31,63	31,67	31,08	31,32	6,23	0,0927	NS
Asas, %	9,87	9,65	9,62	9,60	10,26	0,1700	NS
Dorso, %	22,25	22,26	22,16	21,93	7,09	0,3858	NS
Medalhão, %	1,89	1,91	1,95	1,93	14,74	0,5458	NS
Pele, %	2,29	2,34	2,32	2,30	16,82	0,7649	NS
Retalhos do peito, %	0,73	0,73	0,72	0,74	35,60	0,9705	NS
Gordura, %	,88	1,89	1,86	1,79	34,77	0,7178	NS
Cartilagem do peito, %	0,32	0,33	0,31	0,33	26,62	0,5354	NS

<sup>1</sup>Dieta controle (DC): 3,000 UI Vitamina D<sub>3</sub>;

<sup>2</sup>Dieta 21d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecida no período de 1 a 21dias;

<sup>3</sup>Dieta 35d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecido no período de 1 a 35 dias;

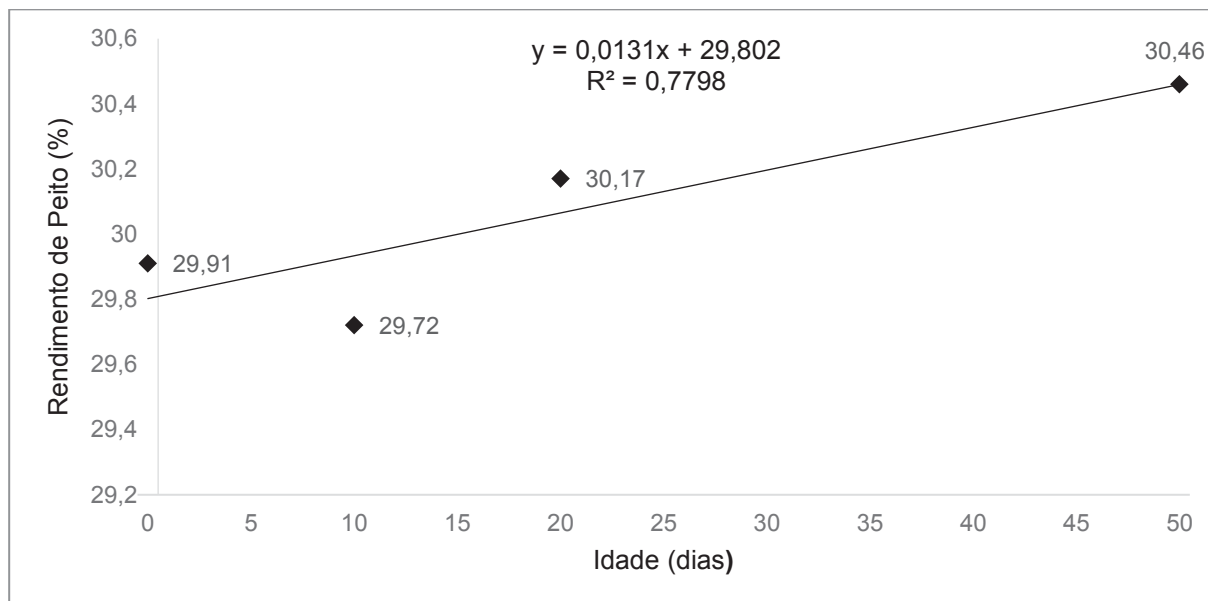
<sup>4</sup>Dieta 46d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecido no período de 1 a 46 dias;

<sup>5</sup>CV: Coeficiente de variação;

<sup>a b</sup> Médias seguidas com letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Turkey (5%).



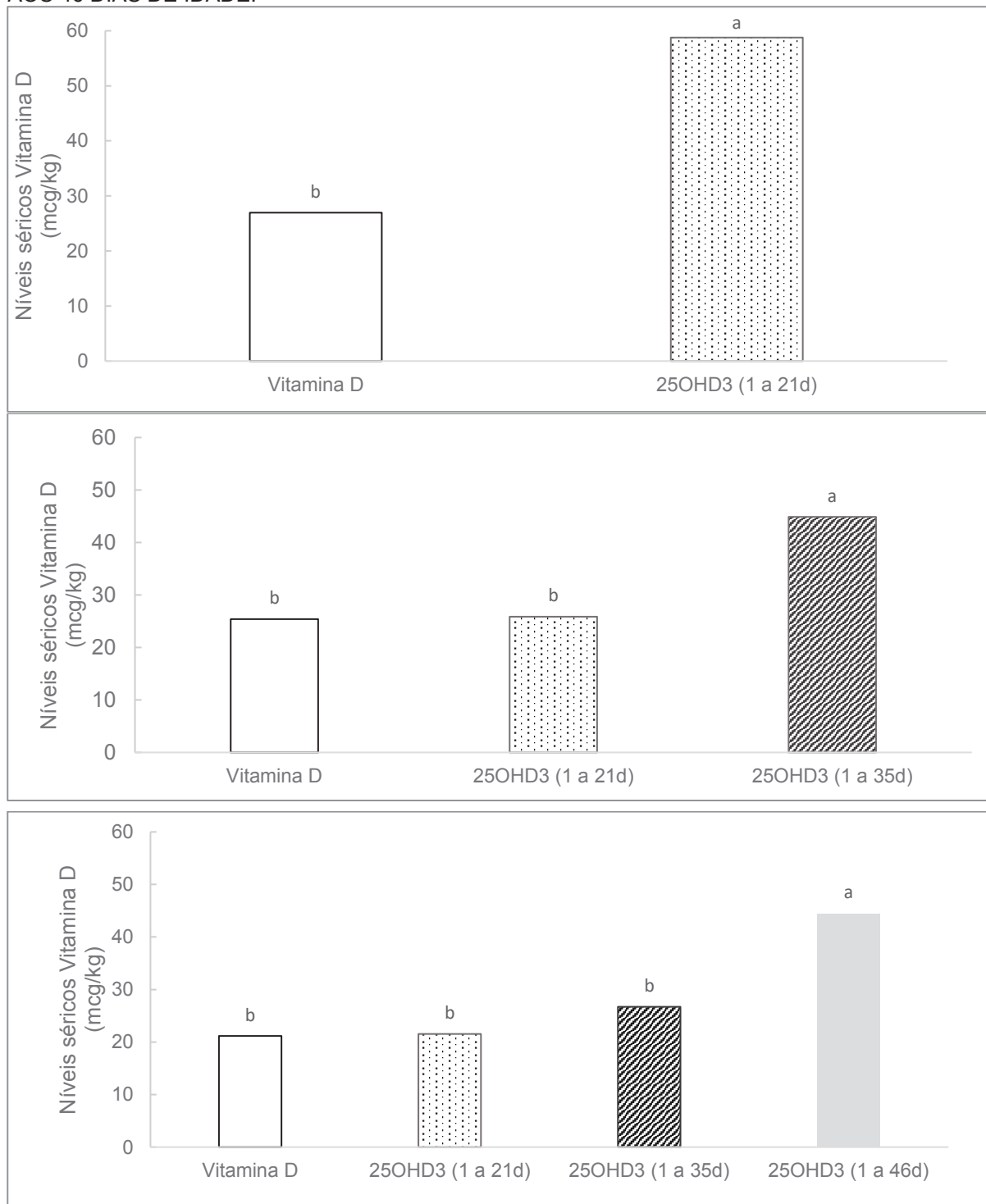
FIGURA 1 - RENDIMENTO DE PEITO (FILÉ + SASSAMI) DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D<sub>3</sub> E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE.



#### Níveis séricos de vitamina D:

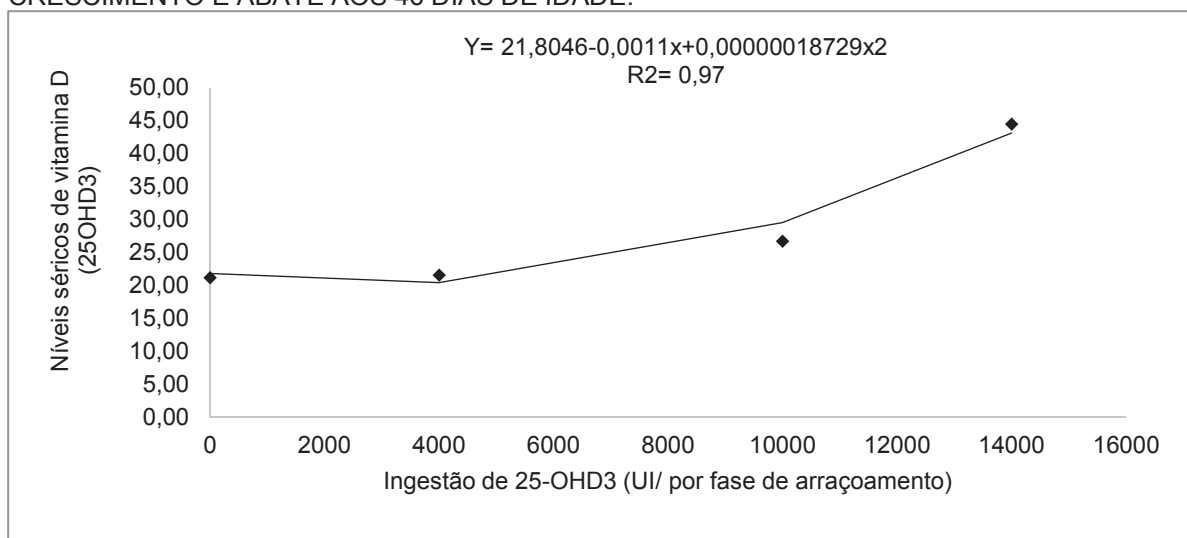
Os tratamentos dietéticos afetaram ( $p < 0,05$ ) os níveis séricos de vitamina D nos diferentes períodos avaliados (Figura 2 e 3). A suplementação dietética de 25-OHD3 aumentou os níveis séricos de vitamina D, à medida que o período de fornecimento foi maior. Pode ser observado, que a manutenção de altos níveis de vitamina D circulantes é dependente da suplementação da associação de D<sub>3</sub> e 25-OHD3. Na figura 3, com base na equação de regressão, o consumo acumulativo de vitamina D<sub>3</sub> a partir de 3.000UI de ingestão de vitamina D<sub>3</sub> (suplementação de 1 a 21 dias), observa-se aumento progressivo da concentração sérica de 25-OHD3.

FIGURA 2 - NÍVEIS SÉRICOS DE 25-OHD3 EM FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D<sub>3</sub> E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INÍCIAS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE.



\*Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (n = 18 / grupo). Barras com letras diferentes mostram diferença significativa entre os programas de alimentação (P < 0,05).

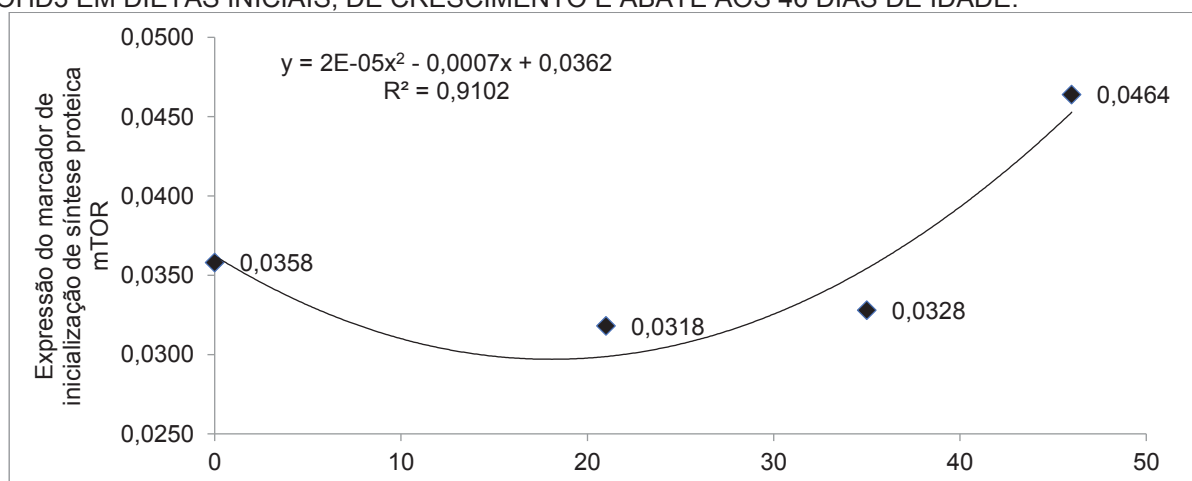
FIGURA 3 - NÍVEIS SÉRICOS DE 25-OHD3 EM FRANGOS DE CORTE DE ACORDO COM A INGESTÃO DE VITAMINA D<sub>3</sub> E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAIS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE.



Expressão do marcador de inicialização de síntese proteica mTOR:

Os resultados da expressão do gene muscular estão apresentados na Figura 4. Foi observada um aumento quadrático ( $p < 0,05$ ) na expressão mTOR a medida que aumento o consumo total de vitamina D (D<sub>3</sub> e 25-OHD<sub>3</sub>). Com base na equação de regressão ( $\hat{Y} = 0,03617 + 0,00070990x + 0,00001965 \cdot x^2$ ), o nível mínimo de expressão de mTOR (0,300) é alcançado na idade de 18 dias.

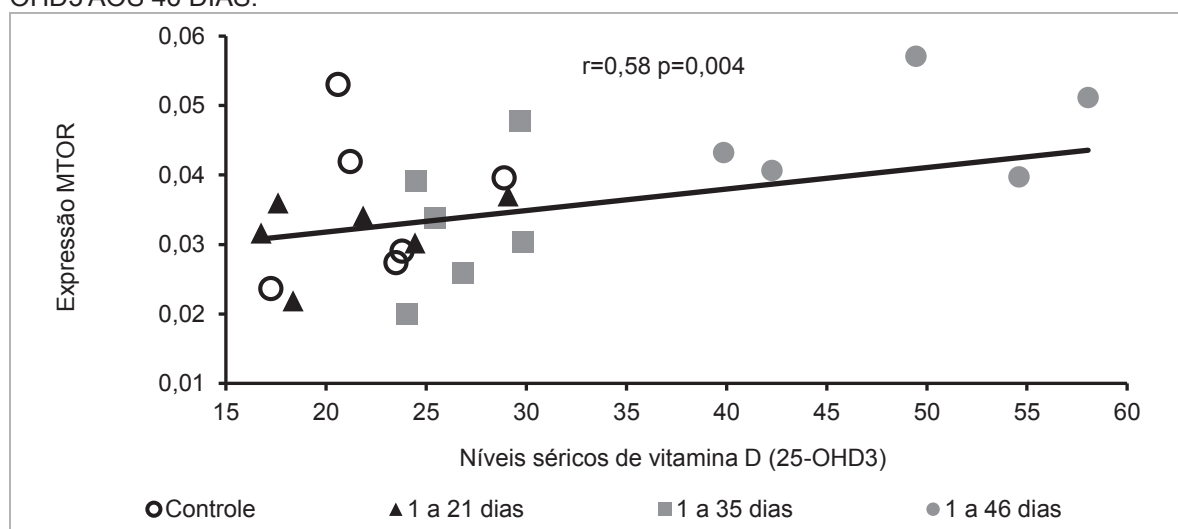
FIGURA 4 - EXPRESSÃO DO MARCADOR DE INICIALIZAÇÃO DE SÍNTESE PROTEICA mTOR NO PEITO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D<sub>3</sub> E COM INCLUSÃO DE 25-OHD<sub>3</sub> EM DIETAS INICIAIS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE.



Foi obseavado correlação significativa ( $p < 0,05$ ) entre a expressão do gene mTOR e o nível sérico de 25-OHD<sub>3</sub> aos 46 dias, conforme demonstrado na figura 5.

FIGURA 5 – CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DO MARCADOR DE INICIALIZAÇÃO DE SÍNTESE PROTEICA mTOR NO PEITO DE FRANGOS DE CORTE E O NÍVEL SÉRICO DE 25-

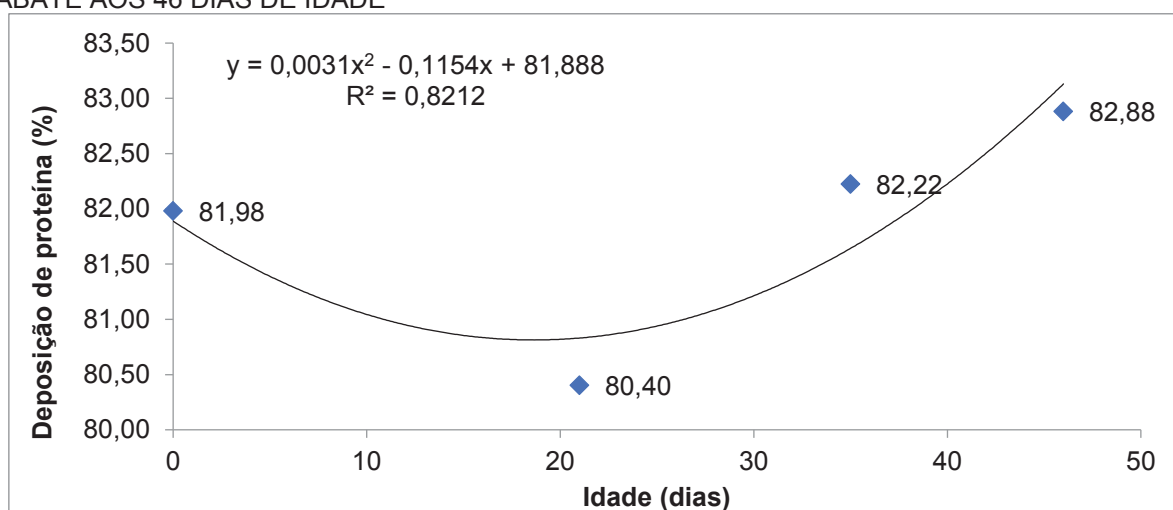
OHD3 AOS 46 DIAS.



### Avaliação de deposição de proteína

Os resultados da deposição de proteína muscular no peito estão apresentados na figura 6. Foi observada um aumento quadrático ( $p<0,05$ ) na deposição de proteína a medida que aumentou o consumo total de vitamina D ( $D_3$  e 25-OHD3). Com base na equação de regressão ( $\hat{Y} = 81,888 + 0,1154x - 0,0031x^2$ ), o menor percentual de deposição de proteína (80%) é alcançado na idade de 19 dias. Observa-se, que a partir dessa idade, ocorre um aumento linear da deposição da proteína muscular, resultado semelhante ao observado na expressão da proteína mTOR.

FIGURA 6. DEPOSIÇÃO DE PROTEÍNA NO PEITO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA  $D_3$  E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAIS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE



Qualidade de carne:

As características de qualidade de carne de frangos alimentados com suplementação de 25-OHD3 no período de 1 a 35 dias apresentaram valor ligeiramente maior ( $p = 0,026$ ) de perda de água por gotejamento, em relação as aves que receberam suplementação de 25-OHD3 no período de 1 a 21 dias, que apresentou menor perda de água por gotejamento, não diferenciando estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 6). Não houve efeito da suplementação de 25-OHD3 em diferentes programas de alimentação para as demais características de qualidade avaliadas.

TABELA 6 - QUALIDADE DA CARNE DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D<sub>3</sub> E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAIS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE.

Características	Vit D (UI/kg) <sup>1</sup>	25-OHD3 (mcg/kg) <sup>2</sup> 1 a 21 dias	25-OHD3 (mcg/kg) <sup>3</sup> 1 a 35 dias	25-OHD3 (mcg/kg) <sup>4</sup> 1 a 46 dias	CV <sup>5</sup> , %	P-valor
Elasticidade, mm	14,88	15,53	15,14	15,42	16,81	0,5460
Cisalhamento, kg	5,48	5,64	5,23	5,95	31,35	0,1900
<i>Perda de água</i>						
Gotejamento, %	2,86ab	2,50b	3,39a	2,85ab	52,47	0,0260
Cozimento, %	39,98	39,23	38,25	40,70	16,98	0,2700
Pressão, %	0,44	0,43	0,46	0,38	80,40	0,6090
Congelamento, %	12,04	13,85	11,01	12,23	4,90	0,4593

<sup>1</sup>Dieta controle (DC): 3,000 UI Vitamina D<sub>3</sub>;

<sup>2</sup>Dieta 21d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecida no período de 1 a 21dias;

<sup>3</sup>Dieta 35d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecido no período de 1 a 35 dias;

<sup>4</sup>Dieta 46d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecido no período de 1 a 46 dias;

<sup>5</sup>CV: Coeficiente de variação;

<sup>a b</sup> Médias seguidas com letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de turkey (5%).

#### Escore de lesão de *Wooden Breast*:

A distribuição de frequência de lesão de *Wooden Breast* (WB) em frangos de corte aos 46 dias de idade sobre o efeito dos diferentes programas de suplementação de D<sub>3</sub> estão apresentados na Tabela 7. Foi observado que as lesões severas (não aceitáveis), independente da suplementação, afetam em média 5% das aves. No presente estudo não foi evidenciado a nível macroscópico diferença ( $p < 0,05$ ) entre os períodos de suplementação.

TABELA 7 - LESÃO DE WOODEN BREAST DE PEITO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D<sub>3</sub> E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAIS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE

Score de lesão	Vit D <sub>3</sub>	25-OHD3	25-OHD3	25-OHD3	P-valor
----------------	--------------------	---------	---------	---------	---------

	(UI/kg) <sup>1</sup>	(mcg/kg) <sup>2</sup>	(mcg/kg) <sup>3</sup>	(mcg/kg) <sup>4</sup>	
	Controle	1 a 21 dias	1 a 35 dias	1 a 46 dias	
Aceitável	96,70	93,81	94,74	94,68	0,833
Não aceitável	3,30	6,19	5,26	5,32	0,833

<sup>1</sup>Dieta controle (DC): 3,000 UI Vitamina D<sub>3</sub>;

<sup>2</sup>Dieta 21d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecida no período de 1 a 21 dias;

<sup>3</sup>Dieta 35d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecido no período de 1 a 35 dias;

<sup>4</sup>Dieta 46d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecido no período de 1 a 46 dias;

Aceitável: peitos que apresentavam estrias pouco visíveis lesões leves, sem dureza ou áreas pálidas ou levemente afetado nas áreas craniais e caudais

Não aceitável: estrias esbranquiçadas, com hemorragia superficial e presença de exsudato estéril na superfície muscular

### Composição do tecido muscular:

Na tabela 8 estão apresentados os dados da composição do tecido muscular do peito, houve efeito significativo da suplementação de 25-OHD3 ( $p < 0,05$ ) na composição do colágeno, sendo maior quando as aves receberam dieta controle. O percentual de gordura e colágeno diminuiu linearmente ( $p < 0,05$ ) e o percentual de tecido muscular aumentou ( $p < 0,05$ ) linearmente de acordo com o período de fornecimento de 25-OHD3.

TABELA 8 - COMPOSIÇÃO DO TECIDO MUSCULAR (%) EM FIBRA MUSCULAR FM), COLÁGENO E GORDURA DO PEITO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D<sub>3</sub> E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INICIAS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE

	Vit D <sub>3</sub> (UI/kg) <sup>1</sup>	25-OHD3 (mcg/kg) <sup>2</sup>	25-OHD3 (mcg/kg) <sup>3</sup>	25-OHD3 (mcg/kg) <sup>4</sup>	CV, %	P-valor	Regressão
		1 a 21 dias	1 a 35 dias	1 a 46 dias			
FM, %	86,81	90,11	88,67	90,11	1,76	0,0537	0,0293 (L)
Colágeno, %	10,14 <sup>a</sup>	7,37 <sup>b</sup>	8,68 <sup>ab</sup>	7,56 <sup>ab</sup>	15,12	0,0414	0,0313 (L)
Gordura, %	3,05	2,52	2,65	2,33	11,60	0,3403	0,0558 (L)

<sup>1</sup>Dieta controle (DC): 3,000 UI Vitamina D<sub>3</sub>;

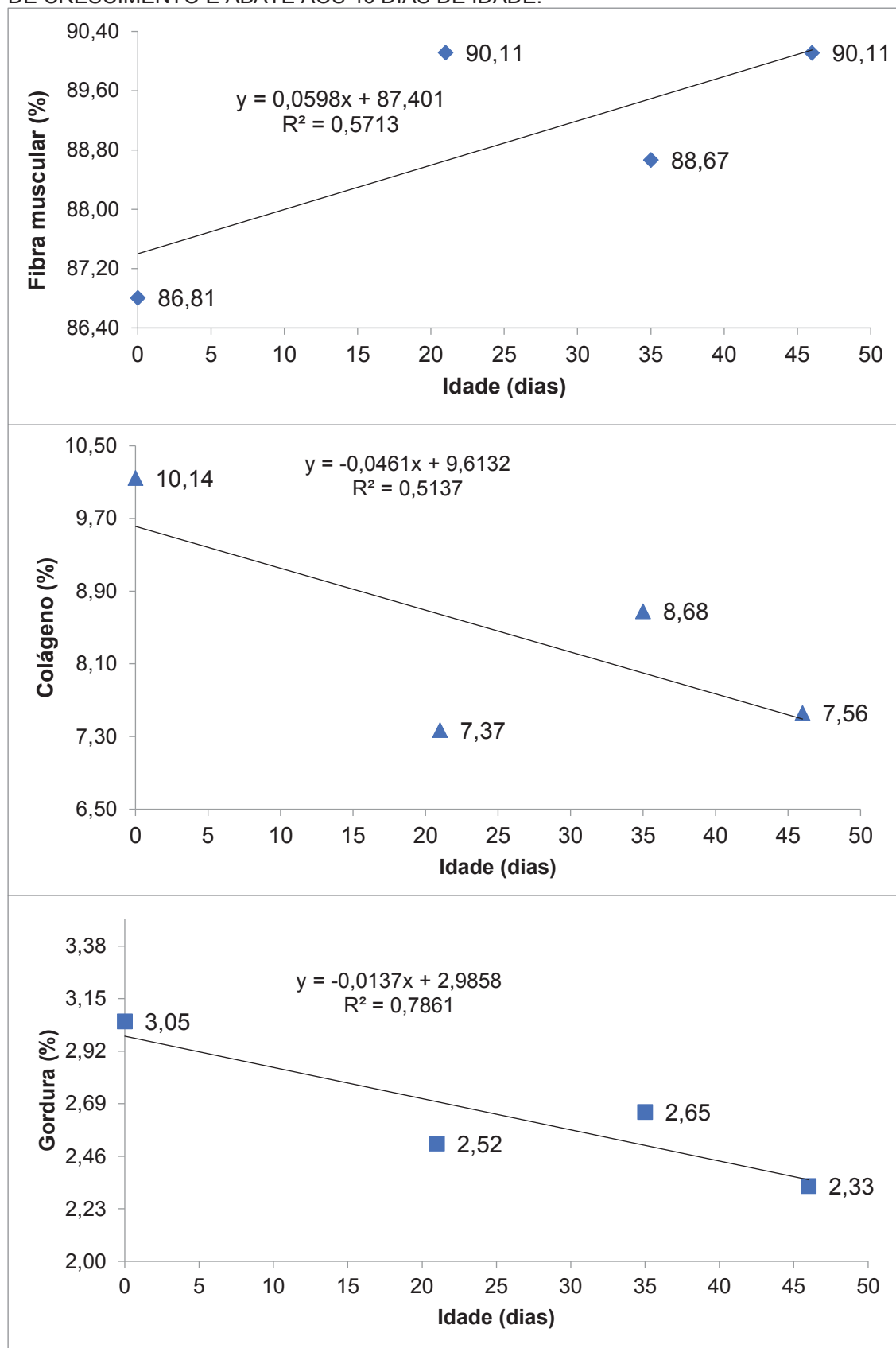
<sup>2</sup>Dieta 21d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecida no período de 1 a 21 dias;

<sup>3</sup>Dieta 35d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecido no período de 1 a 35 dias;

<sup>4</sup>Dieta 46d: DC + 2760 UI/kg 25-OHD3 fornecido no período de 1 a 46 dias;

<sup>a b</sup> Médias seguidas com letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Turkey (5%).

FIGURA 7. COMPOSIÇÃO DO TECIDO MUSCULAR DO PEITO DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D<sub>3</sub> E COM INCLUSÃO DE 25-OHD3 EM DIETAS INÍCIAS, DE CRESCIMENTO E ABATE AOS 46 DIAS DE IDADE.



Os níveis elevados de vitamina D<sub>3</sub> nas concentrações séricas obtidos neste estudo indicam que a suplementação de 25-OHD3 pode aumentar os níveis da vitamina D em frangos de corte. Este resultado está de acordo com estudos anteriores (YARGER et al., 1995; KHAN et al., 2010; HUTTON et al., 2014). De acordo com Ovesen et al. (2003), em humanos, cerca de 80% da atividade circulante da vitamina D está associada à 25-OHD3. Da mesma forma, em pintos, a 25-OHD3 também é reconhecida como o principal metabólito da vitamina D no sangue (HAUSSLER; RASMUSSEN, 1972).

A absorção do 25-hidroxicolecalciferol foi relatada mais eficiente do que a vitamina D<sub>3</sub> no intestino delgado (BAR et al., 1980), a absorção mais rápida pode ser atribuída à ligação de 25-OHD3 com proteínas que foram identificadas em células intestinais (NECHAMA et al., 1977). Essa proteína tem mais afinidade por 25-OHD3 que é pelo menos 1000 vezes maior do que outros metabólitos de D<sub>3</sub> (TEEGARDEN et al., 2000).

Em um estudo com níveis de vitamina D e suplementação de 25-OHD3 para frangos de corte no período de 1 a 21 dias de idade, Vazquez et al. (2017) observaram que as dietas suplementadas com 25-OHD3 resultaram em valores séricos 2,63 maiores do que na ausência de suplementação. Bozkurt et al. (2017) relataram que a suplementação com 25-OHD3 elevou o status de vitamina D em frangos de corte, com rações que atendem a exigência mineral.

Evidências sobre o mecanismo pelo qual o 25-OHD3 influencia o crescimento hipertrófico do músculo, composição e tamanho de fibra só emergiram recentemente (HUTTON et al., 2014; VIGNALE et al., 2015; BOZKURT et al., 2017).

O aumento do rendimento de peito sem alteração no consumo de ração e no peso corporal observados neste estudo indica que o 25-OHD3 pode afetar o gasto energético como relatado por Wong et al (2009) e Vignale et al (2015). O aprimoramento do status de vitamina D no metabolismo resulta em mudanças na atividade do músculo (HUTTON et al., 2014). Esses autores observaram aumento numérico na densidade de fibra muscular no peito de frangos de corte suplementados com 25-OHD3.

Em estudo, Vieites et al. (2014), não encontraram diferença para o rendimento de carcaça, peito e asas, em frangos de corte machos suplementados com diferentes níveis de 25-hidroxicolecalciferol/kg de ração. Similarmente, ao estudarem dois níveis



de suplementação de vitamina D provenientes de D<sub>3</sub> e 25-OHD<sub>3</sub>, para frangos de corte, Mesquita et al. (2012) não encontraram diferenças para rendimento de carcaça.

Nesse estudo, foi possível confirmar um mecanismo que comprova que o metabólito 25-OHD<sub>3</sub> beneficia o crescimento muscular em frangos de corte. Vignale et al. (2015) já haviam demonstrado que o mecanismo de atuação seria por meio da via mTOR.

Esses autores demonstraram que o uso de 25-OHD<sub>3</sub> aumentou as concentrações circulantes do metabólito em 126%, a produção de carne de peito e a taxa fracionária de síntese proteica em 3 vezes comparado a dieta com vitamina D<sub>3</sub> (2760 IU/kg). Análises moleculares revelaram que o músculo do peito de frangos consumindo o 25-OHD<sub>3</sub> por 42 dias expressaram significativamente suas concentrações de receptor de vitamina D.

A via mTOR está amplamente envolvida na regulação da síntese de proteínas (CHEN et al., 2016). A estimulação da síntese proteica é realizada através de um aumento nas taxas no ponto de tradução, processo que envolve diversos fatores de iniciação, quinases e fosfatases, cujas atividades são reguladas por fosforilação.

No presente estudo a expressão do mTOR foi determinada no músculo do peito, onde foi observado que a partir dos 18 dias há uma tendência linear à medida em que a suplementação com metabólito da vitamina D foi oferecido por um período maior. Foi evidenciado o aumento da deposição de proteína na musculatura do peito das aves, corroborando com o aumento linear observado no rendimento de peito. Conforme o aumento do consumo de vitamina D e 25-OHD<sub>3</sub> pelos frangos, maior deposição de proteína através da via mTOR foi observado.

A capacidade de retenção de água é uma das características de qualidade de carne mais importantes, pois afeta a aparência e o rendimento do produto (BOZKURT et al., 2017). No presente estudo, quatro métodos diferentes (perda por gotejamento, cozimento, pressão e congelamento) foram utilizados para estimar a capacidade de retenção de água dos músculos do peito.

O músculo magro contém aproximadamente 75% de água, sendo que a maior parte dessa água é mantida dentro da estrutura do músculo em células musculares. Por ser uma molécula dipolar, a água é atraída para espécies carregadas como a proteína, dessa forma a água nas células musculares está intimamente ligada à proteína (HUFF-LONERGAN et al., 2005). Por definição, a água ligada é a água que existe ao redor de constituintes não-aquosos, como a proteína, e tem mobilidade

reduzida, dessa forma não se desloca facilmente para outros compartimentos. Essa água é muito resistente ao congelamento e pode ser expelido pelo aquecimento convencional (FENNEMA, 1985).

Já Bozkurt et al (2017) relataram maior perda de água por gotejamento pela suplementação com 25-OHD3, resultado observado no presente trabalho no período de 1 a 35 dias comparado a suplementação de 1 a 21 dias. Em estudo com duas fontes de vitamina D (vitamina D3 e 25-OHD3) e quatro níveis de redução de Ca (0%, 10%, 20% e 30%), Tizziani (2017) observaram que a qualidade da carne pode ser afetada pelo nível de redução de Ca da dieta, não sofrendo interferência da fonte de vitamina.

O *wooden breast (WB)* ou peito de madeira é uma miopatia muscular ainda comum na indústria avícola (LORENZI et al., 2014; KUTTAPPAN et al., 2016). Os aspectos negativos tornam o produto indesejável para o mercado, assim como em produtos degradados, os tecidos musculares apresentam funcionalidade proteica reduzida, redução da capacidade de retenção de água e aumento na perda do cozimento, tornando-os menos aceitáveis para uso em produtos processados (MUDALAL et al., 2014).

A ocorrência de WB pode ser influenciada pelo peso corporal (PETRACCI et al., 2013), bem como pela taxa de crescimento (KUTTAPAN et al., 2013). Kuttapan et al. (2013) relataram que a WB está associada ao aumento da ocorrência de danos musculares, que são resultados do crescimento muscular de seus sistemas.

Alta proporção de fibras musculares necróticas existe na miopatia WB, faz com que ocorra a ativação de mecanismos para reparar as fibras musculares danificadas, estimulando tanto a proliferação quanto a diferenciação de células satélites. Apesar da ativação de mecanismos de reparação celular mediada pelas células satélites, a regeneração da fibra muscular resulta em fibras musculares que são significativamente menores em diâmetro do que as fibras musculares não afetadas (VELLEMAN, 2015). Hutton et al. (2014) mostraram que a suplementação de 25-OHD3 estimula a atividade de células satélites do músculo pectoralis major da ave, o que pode ter contribuído com a menor taxa de substituição de tecido muscular por colágeno e gordura observados no presente experimento (Figura 7).

Soglia et al. (2016) avaliaram fatores relacionados a ocorrência das miopatias white striping e wooden breast através de análises físico químicas. E concluíram que os níveis de umidade, colágeno e gordura aumentaram conforme o aumento da

intensidade de Write Striping e wood brest, bem como redução significativa de proteína bruta.

Em estudo realizado por Kuttappan et al. (2013) foi observado acréscimo no teor de gordura muscular e decréscimo de proteína, conforme o aumento do grau de white striping, concluindo que estas alterações histopatológicas indicam uma miopatia degenerativa que pode estar associada com a taxa de crescimento das aves.

Com o objetivo de investigar os genes expressos nos peitos de frangos de corte que apresentavam a miopatia Write Striping, Zambonelli et al. (2016) identificaram um aumento do nível de gordura no tecido das aves. Da mesma forma, Baldi et al. (2018) pesquisaram os fatores envolvidos na qualidade carne de peitos de frango que apresentaram miopatias, observaram redução da porcentagem de proteína, aumento da umidade e da gordura em peitos com a miopatia.

A utilização conjunta das duas formas de suplementação de vitamina D contribuiu no aumento do rendimento de carne de peito e pode ser indicada em dietas de frangos de corte para o fornecimento em toda fase produtiva dos frangos de corte.

## CONCLUSÃO

A utilização da suplementação de 3.000 UI de vitamina D e de 2.760 UI do metabólito 25-OHD3 em rações de frangos de corte, com níveis adequados de cálcio e fósforo, aumentou os níveis séricos de vitamina D e resultou em maior rendimento de carcaça e de peito.

O aumento da síntese proteica em resposta à suplementação de 25-OHD3 foi comprovado pela via mTOR, através do aumento das taxas traducionais proteicas, confirmado pelo aumento da composição proteica e rendimento do peito.

A suplementação de vitamina D e 25-OHD3 reduziu a deposição de gordura e colágeno no peito dos frangos de corte e aumentou a deposição de tecido muscular.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS – CAPÍTULO 2

AVIAGEN. **Manual de Manejo. 2014.** Disponível em: [http://en.aviagen.com/assets/Tech\\_Center/BB\\_Foreign\\_Language\\_Docs/Portuguese/Ross-Broiler-Handbook-2014-PT.pdf](http://en.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Portuguese/Ross-Broiler-Handbook-2014-PT.pdf). Acesso em: 18 de dezembro de 2018.

BAR, A.; SHINDER, D.; YOSEFI, S.; VAX, E.; PLAVNIK, I. Metabolism and requirements for calcium and phosphorus in the fast-growing chicken as affected by age. **British Journal of Nutrition**, v. 89, p. 51-60, 2003.

BERRI, C.; LE BIHAN-DUVAL, E.; DEBUT, M.; SANTÉ-LHOUTELLIER, V.; BAEZA, E.; GIGAUD, V.; JÉGO, Y.; DUCLOS, M. J. Consequence of muscle hypertrophy on characteristics of Pectoralis major muscle and breast meat quality of broiler chickens. **Journal Animal Science**, v. 85, p. 2005-2011, 2007.

BOCCARD, R.; BUCHTER, L.; CASTEELS, E.; COSENTINO, E.; DRANSFIELD, E.; HOOD D. E.; JOSEPH, R. I.; MACDOUGALL, D. B.; RHODES, D. N.; SCHO, I. N. Procedures for measuring meat quality characteristics in beef production experiments. Report of a working group in the commission of the European communities' (CEC) beef production research programme. **Livestock Production Science**, v. 8, p. 385–97. 1981.

BOZKURT, M.; YALÇIN, S.; KOÇER, B.; TÜZÜN, A. E.; AKŞIT, H.; ÖZKAN, S.; UYGUN, M.; EGE, G.; GÜVEN, G.; YILDIZ, O. Effects of enhancing vitamin D status by 25-hydroxycholecalciferol supplementation, alone or in combination with calcium and phosphorus, on sternum mineralisation and breast meat quality in broilers. **British Poultry Science**, 2017.

BRIDI, A. M.; SILVA, C. A. **Avaliação da carne suína**. Londrina: Midiograf, 120 p. 2009.

CHEN, X.; ZHANG, Q.; APPLGATE, T. J. Impact of dietary branched chain amino acids concentration on broiler chicks during aflatoxicosis. **Poultry Science**, v. 95, p. 1281–1289, 2016.

CHOU, S. H.; CHUNG, T. K.; YU, B. Effects of supplemental 25-hydroxycholecalciferol on growth performance, small intestinal morphology, and immune response of broiler chickens. **Journal Poultry Science**, v. 88, p. 2333-2341, 2009.

CLARK, D. L.; VELLEMAN, S. G. Spatial influence on breast muscle morphological structure, myofiber size, and gene expression associated with the wooden breast myopathy in broilers. **Poultry Science**, v. 95, p. 2930-2945, 2017.

CROZIER, S. J., S. R. KIMBALL, S. W. EMMERT, J. C. ANTHONY, L. S. JEFFERSON. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. **Journal Nutrition**, 135:376-382, 2005.

DSM. **Produtos Nutricionais, 2012.** Disponível em <<http://www.dsm.com/E9AFBFB8420E40AA8F02DE5E96C730DB/FinalDownload/DownloadId089DB5A62DDB342F465435EF7D8F7C13/E9AFBFB8420E40AA8F02DE>>

5E96C730DB/content/dam/dsm/anh/en\_US/documents/OVN\_supplementation\_guidelines.pdf> Acesso em 21 de novembro 2018.

FRITTS, C. A.; WALDROUP, P. W. Effect of source and level of vitamin D on live performance and bone development in growing broilers. **The Journal Applied of Poultry Research**. v. 12, p. 45–52, 2003.

GLYNN, E. L., C. S. FRY, M. J. DRUMMOND, K. L. TIMMERMAN, S. DHANANI, E. VOLPI, B. B. RASMUSSEN. Excess leucine intake enhances muscle anabolic signaling but not net protein anabolism in young men and women. **Journal Nutrition**, 140:1970-1976, 2010.

GÓMEZ-VERDUZCO, G.; MORALES-LÓPEZ, R. AVILA-GOZÁLEZ, E. Use of 25-hydroxycholecalciferol in Diets of Broiler Chickens: Effects on Growth Performance, Immunity and Bone Calcification. **Japan Poultry Science**. v, 50, p. 60-64, 2013.

HAUSSLER, M. R.; RASMUSSEN, H. The metabolism of vitamin D3 in the chick. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 2328-2335, 1972.

HAVENSTEIN, G. B.; FERKET, P. R.; QUERSHI, M. A. Growth, Livability, and Feed Conversion of 1957 Versus 2001 Broilers When Fed Representative 1957 and 2001 Broiler Diets. **Journal Poultry Science**, v. 82, p. 1500-1508, 2003.

HUFF-LONERGAN, E.; LONERGAN, S. M. Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. **Meat Science**, v. 71, p. 194-204, 2005.

HUTTON, K. C.; VAUGHN, M. A.; LITTA, G.; TURNER, B. J.; STARKEY, J. D. Effect of vitamin D status improvement with 25-hydroxycholecalciferol on skeletal muscle growth characteristics and satellite cell activity in broiler chickens. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 3291-3299, 2014.

KHAN, S. H.; SHAHID, R.; MIAN, A. A.; SARDAR, R.; ANJUM, M. A. Effect of the level of cholecalciferol supplementation of broiler diets on the performance and tibial dyschondroplasia. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. v. 94, p. 584–593, 2010.

KIJOWSKI, J., KONSTANCZAK, M. Deep pectoral myopathy in broiler chickens. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**. v. 53, p. 487–491, 2009.

KUTTAPPAN, V. A.; OWENS, C. M.; COON, C.; HARGIS, B. M.; VAZQUEZ-ANON, M. Incidence of broiler breast myopathies at 2 different ages and its impact on selected raw meat quality parameters. **Poultry Science**, v.96, p.3005–3009, 2017.

KUTTAPPAN, V. A.; SHIVAPRASAD, H. L.; SHAW, D. P.; VALENTINE, B. A.; HARGIS, B. M.; CLARK, F. D.; MCKEE, S. R.; OWENS, C. M. Pathological changes associated with white striping in broiler breast muscles. **Poultry Science**, v. 92, p. 331–338, 2013.

LEE, J. 2012. Molecular basis of feed efficiency in meat-type chickens. PhD Diss. Univ. Georgia. Athens, Georgia.

LORENZI, M.; MUDALAL, S.; CAVANI, C.; PETRACCI, M. Incidence of white striping under commercial conditions in médium and heavy broiler chickens in Italy. **Journal Applied Poultry Research**, v. 23, p. 754–758, 2014.

MESQUITA, F. R. **Níveis e formas de vitamina D em rações para frangos de corte**. 101 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MICHALCZUK, M.; PIETRZAK, D.; NIEMIEC, J.; MROCZEK, J. Effectiveness of vitamin D3 and calcidiol (25-OHD3) application in feeding broiler chickens-production performance and meat quality. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 60, p. 121-126, 2010.

MUDALAL, S.; BABINI, E.; CAVANI, C.; PETRACCI, M. Quantity and functionality of protein fractions in chicken breast fillets affected by white striping. **Poultry Science**, v. 93, p. 2108–2116, 2014.

MUDALAL, S.; LORENZI, M.; SOGLIA, F.; OAVANI, C.; PETRACCI, M. Implications of white striping and wooden breast abnormalities on quality traits of raw and marinated chicken meat. **Animal**, v. 9, p. 728–734, 2015.

NECHAMA, H.; HOFF, D.; HARELL, A.; EDELSTEIN, S. The intestinal absorption of vitamin D and its metabolites. *Journal of Molecular Medicine*, v. 2, p. 413-422, 1977.  
OLIVO, R. **O mundo do frango**. Criciúma, p. 239-272. 2006.

OVESEN, L., BROTH, C.; JAKOBSEN, J. Food contents and biological activity of 25-hydroxyvitamin D: a vitamin D metabolite to be reckoned with? **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 47, p. 107-113, 2003.

PETRACCI, M.; MUDALAL S.; BONFIGLIO, A.; CAVANI, C. Occurrence of white striping under commercial conditions and its impact on breast meat quality in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 92, p. 1670–1675, 2013.

ROJA, I.C.O. **Leucina e valina em dietas de baixa proteína para frangos de corte**. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de Concentração Produção Animal, Maringá, 2015.

SCHMIDT, C. J.; PERSIA, M. E.; FEIERSTEIN, E.; KINGHAM, B.; SAYLOR, W. W. Comparison of a modern broiler line and a heritage line unselected since the 1959s. **Poultry Science**, v. 88, p. 2610-2619, 2009.

SILVA SOBRINHO, A.G. **Body composition and characteristics of carcass from lambs of different genotypes and ages at slaughter**. 54f. Thesis (PostDoctorate in Sheep Meat Production) – Massey University, Palmerston North, 1999.



SURYAWAN, A., R. M. TORRAZZA, M. C. GAZZANEO, R. A. ORELLANA, M. L. FIOROTTO, S. W. ELKADI, N. SRIVASTAVA, H. V. NGUYEN, T. A. DAVIS. Enteral leucine supplementation increases protein synthesis in skeletal and cardiac muscles and visceral tissues of neonatal pigs through mTORC1-dependent pathways. **Pediatric Research**, 71(401):324-31, 2012.

TEEGARDEN, D.; NICKEL, K. P.; SHI, L. Characterization of 25-hydroxvitamin D binding protein from intestinal cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, p. 845-849, 2000.

TICKLE, P. G.; PAXTON, H.; RANKIN, J. W.; HUTCHINSON, J. R.; COOD, J. R. Anatomical and biomechanical traits of broiler chickens across ontogeny. Part I. Anatomy of the musculoskeletal respiratory apparatus and changes in organ size. **Peer J.**, p. 14-17, 2014.

TIZZIANI, T. **Redução dos níveis de cálcio em rações suplementadas com diferentes fontes de vitamina D para frangos de corte em ambiente de termoneutralidade**. 100 f. Tese (Doutorado) - Curso de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

TORRAZZA R. M., A. SURYAWAN, M. C. GAZZANEO, R. A. ORELLANA, J. W. FRANK, H. V. NGUYEN, M. L. FIOROTTO, S. EL-KADI, T. A. DAVIS. Leucine supplementation of a low-protein meal increases skeletal muscle and visceral tissue protein synthesis in 20 neonatal pigs by stimulating mTOR-dependent translation initiation. **Journal of Nutrition**, 140:2145–52, 2010.

VAZQUEZ, J. R.; GÓMEZ, G. V.; LÓPEZ, C. C.; CORTÉS, A. C.; DIÁZ, A. C.; FERNANDEZ, S. R. T.; ROSALES, E. M.; AVILA, A. G. Effects of 25-hydroxycholecalciferol with two D3 vitamin levels on production and immunity parameters in broiler chickens. **Journal Physiology Animal Nutrition**, p. 1-5, 2017.

VELLEMAN, S. G. Relationship of skeletal muscle development and growth to breast muscle myopathies: A Review. **Avian Diseases**, v. 59, p. 525–531, 2015.

VELLEMAN, S. G.; CLARK, D. L. Histopathologic and myogenic gene expression changes associated with wooden breast in broiler breast muscles. **Avian Diseases**, v. 59, p. 410–418, 2015.

VIEITES, F. M.; NALON, R. P.; SANTOS, A. L. Desempenho, rendimento de carcaça e cortes nobres de frangos de corte alimentados com rações suplementadas com *Solanum glaucophyllum*. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 35, n. 3, p. 1617-1626, 2014.

VIGNALE, K.; GREENE, E. S.; CALDAS, J. V.; ENGLAND, J. A.; BOONSINCHAI, N.; SODSEE, P.; POLLOCK, E. D.; DRIDI, S.; COON, C. N. 25-hydroxycholecalciferol enhances male broiler breast meat yield through the mTOR pathway. **Journal of Nutrition**, v. 145, p. 855-863, 2015.

VISSOTTO, M.R. **Programas vitamínicos e diferentes fontes minerais nas dietas de frangos de corte**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, Programa de Pós Graduação em Ciência Animal. 2016.



WEBER, G.M.; WITSCHI, A.K.M.; WENK, C.; MARTENS, H. Effects of dietary 25-hydroxycholecalciferol and cholecalciferol on blood vitamin D and mineral status, bone turnover, milk composition, and reproductive performance of sows. **Journal of animal Science**. 2014.

WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M.; DIKEMAN, M.E.; CROUSE, J.D.; HUNT, M.C.; KLEMM, R.D. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 2716 – 2728, 1990.

WOELFEL, R. L.; OWENS, C. M.; HIRSCHLER, E. M.; MARTINEZ-DAWSON, R.; SAMS, A. R. The characterization and incidence of pale, soft, and exudative broiler meat in a commercial processing plant. **Poultry Science**, v. 81, p. 579–584, 2002.

YARGER, J. G.; SAUNDERS, C. A.; MCNAUGHTON, J. L.; QUARLES, C. L.; HOLLIS, B. W.; GRAY, R. W. Comparison of dietary 25-hydroxycholecalciferol and cholecalciferol in broiler chickens. **Poultry Science**. v. 74, p. 1159–1167, 1995.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A dieta pode modificar a qualidade da carne, podendo alterar seu valor proteico, perfil de aminoácidos, perfil de ácidos graxos e quantidade de vitaminas e minerais. O emprego de maiores níveis vitamínicos para frangos vem sendo utilizado a fim de compensar variações no consumo, biodisponibilidade das vitaminas da dieta, fatores antiquiditativos dos alimentos, estresse, entre outros. Além disso, Atualmente, novas variáveis, além dos sinais de deficiência e desempenho, estão sendo avaliadas a fim de determinar as exigências de vitaminas para frangos, como resposta imune, bem-estar e enriquecimento de vitaminas na carcaça, visando melhor aspecto, maior tempo de prateleira e valor nutricional da carne para os consumidores.

O rendimento de carne do peito é o maior direcionador econômico do sistema de produção de carne de frangos, uma vez que agrega maior valor econômico. Entretanto, vários processos metabólicos e fisiológicos antecederam a deposição de carne, essencialmente a síntese proteica. O metabolismo proteico celular, incluindo a síntese e degradação é essencial para o crescimento hipertrófico. No entanto, este processo é um dos mais complexos da bioquímica, orquestrado por inúmeros fatores, principalmente de ordem nutricional.

Um fator chave da síntese proteica no músculo esquelético, por regular numerosos componentes envolvidos na síntese proteica, incluindo fatores de iniciação e alongação, é a participação de uma proteína conhecida como mTOR (mammalian target of rapamycin). Essa proteína quinase exerce um papel fundamental na regulação do crescimento muscular, e vários estudos evidenciaram a importância da mTOR como mediador central do metabolismo e crescimento.

No presente estudo, avaliou-se a suplementação do metabólito formado a partir da vitamina D, a 25-OHD3 em dietas iniciais, de crescimento ou abate associada à vitamina D3, cuja disponibilização da vitamina para todos os processos metabólicos dos quais ela participa é mais ativa. Observou-se que os níveis séricos do metabólito 25-OHD3 foram crescentes de acordo com o tempo de suplementação. Em resposta, houve aumento da expressão da proteína mTOR, resultando em aumento na deposição de proteína muscular e consequentemente no rendimento do peito dos frangos de corte.

Além do aumento da carne de peito, a suplementação com o metabólito pode ser uma estratégia interessante da cadeia avícola para incorporar um nutriente

essencial na carne de frangos. A vitamina D é lipossolúvel, o que permite o seu armazenamento. A busca por um estilo de vida mais saudável tem sido crescente e a alimentação tem um importante papel neste cenário. A carne de frango enriquecida com nutrientes, a exemplo das vitaminas lipossolúveis, se enquadra na categoria de alimentos funcionais, por serem dotados de benefícios adicionais à saúde além da função básica de nutrir, buscam suprir essa demanda, constituindo uma grande tendência do setor alimentício.

As mudanças nos hábitos de consumo e na busca por segurança alimentar, tem forçado o setor a atender a demanda e a sensibilidade desses clientes que estão em busca de produtos agregados de alta qualidade e de valor nutricional.

O consumidor, atualmente preocupa-se com a origem do alimento que consome e com questões relativas a forma de criação e ao bem-estar animal. Os consumidores desejam comer carne com atributos diferenciados, isto é, carne oriunda de animais que foram criados, tratados e abatidos em sistemas que promovam o seu bem-estar, com o mínimo desafio por doenças e que sejam ambientalmente corretos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA: Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual de 2018**. Disponível em: <[www.abpa.com.br](http://www.abpa.com.br)>. Acesso em: 05 set. 2018.

ABREU, D.A.F.; EYLES, D.; FÉRON, F. Vitamin D, a neuro-immunomodulator: implications for neurodegenerative and autoimmune diseases. **Psychoneuroendocrino**, v. 34, p. 265-277, 2009.

ALMEIDA PAZ, I. C. L. Problemas locomotores e técnicas de mensuração. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2008, Santos. **Anais...** São Paulo, 2008. p. 57-68.

ALMEIDA PAZ, I. C. L.; BRUNO, L. D. G. Bone mineral density: review. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 8, n. 2, p. 69-73, 2006.

ALVES, M. C. F.; ALMEIDA PAZ, I. C. L.; CALDARA, F. R. Equilíbrio e problemas locomotores em frangos de corte. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 7, p. 35-44, 2013.

APPLEGATE, T.J.; WEBEL, D.M.; LEI, X.G. Efficacy of a phytase derived from *Escherichia coli* and expressed in yeast on phosphorus utilization and bone mineralization in turkeys poult. **Poultry Science**, v.82, p.1726-1732, 2003.

ASCENÇÃO, C.F.R. **Estudos de vias de sinalização celular que impactam na atividade da enzima glutaminase**. Dissertação (mestrado)- Universidade Estadual de Campinas- Campinas -SP. 2014.

BAILEY, R.A. et al. The genetic basics of pectoralis major myopathies in modern broiler chicken lines. **Poultry Science**, Oxford Academy, v. 94, n. 12, p. 2870-2879, dez. 2015.

BAR, A.; SHARVIT, M.; NOFF, D.; EDELSTEIN, S.; HURWITZ, S. Absorption and excretion of cholecalciferol and of 25- hydroxycholecalciferol and metabolites in birds. **Journal of Nutrition**, v. 110, p. 1930-1934, 1980.

BARBOSA, A. A.; MORAES, G. H. K.; TORRES, R. A.; REIS, D. T.; RODRIGUES, C. S. E MÜLLER, E. S. Avaliação da qualidade óssea mediante parâmetros morfométricos, bioquímicos e biomecânicos em frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 772-778, 2010.

BARTOSZEWSKA, M.; KAMBOJ, M.; PATEL, D. R. Vitamin D, Muscle Function, and Exercise Performance. **Pediatric Clinics of North America**, v. 57, p. 849-861, 2010.

BERTOL, T. M. **Estresse pré-abate: consequências para a sobrevivência e a qualidade da carne em suínos**. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/?/artigos/2004/artigo-2004-n004.html>. Acesso em 15 de dezembro de 2018.

BERTECHINI, A.G. **Nutrição de monogástricos**. Lavras: Editora UFLA, 2006. p.179-181.

BHAT, M.; NOOLU, B.; QADRI, S. S.; ISMAIL, A. Vitamin D deficiency decreases adiposity in rats and causes altered expression of uncoupling proteins and steroid receptor coactivator. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 144, p. 304–12, 2014.

BRITO, J. A. G.; BETERCHINI, A. G.; FASSANI, E. J.; RODRIGUES, P. B.; LIMA, E. M. C.; MENEGHETTI, C. Efeito da vitamina D<sub>3</sub> e 25-hidroxicolecalciferol sobre o desempenho, o rendimento de carcaça e a morfologia intestinal de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 2656-2663, 2010.

CASTRO, L. C. G. O sistema endocrinológico vitamina D. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 55, p. 566-575, 2011.

CATORNA, M.T., ZHU, Y., FROICU, M., WHITTKE, A. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, and the immune system. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 80:1717-1720, 2004.

COOK, M. E. Skeletal deformities and their causes: Introduction. **Poultry Science**, v. 79, n. 7, p. 982-984, 2000.

CORTOT, A.; ARMAND, J. P.; SORIA, J. C. Les inhibiteurs Luiz Claudio Gonçalves de Castro. O sistema endocrinológico vitamina D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 55, n. 8, p. 19-26, 2006.

COTO, C.; YAN, F.; CERRATE, S.; WANG, Z.; SACAKLI, P.; HALLEY, J.T.; WIERNUSZ, C. J.; MARTINEZ, A.; WALDROUP, P. W. Effects of dietary levels of calcium and nonphytate phosphorus in broiler starter diets on live performance, bone development and growth plate conditions in male chicks fed a corn-based diet. **Internacional Journal of Poultry Science**, v. 7, p. 638-645, 2008.

CRENSHAW, T. D.; RORTVEDT, L. A.; HASSEN, Z. Triennial growth symposium: a novel pathway for vitamin D-mediated phosphate homeostasis: implications for skeleton growth and mineralization. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 7, p. 1957-1964, July 2011.

CRYSTAL, R. G. Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success, **Science**, v. 270, 404-410, 1995.

CHAMPE, P.C., HARVEY, R.A. Bioquímica ilustrada. 2.ed. Porto Alegre: **Artes Médicas**, P. 446, 1996.

FEDDES, J. J. R.; EMMANUEL, E. J.; ZUIDHOF, M. J. Broiler performance, body weight variance, feed and water intake, and carcass quality at different stocking densities. **Poultry Science**, n. 81, p. 774–779, 2002.

FERNANDES, T.; SOCI, U. P.; ALVES, C. R.; CARMO, E. C.; BARROS, J. G.; OLIVEIRA, E. M. Determinantes moleculares da hipertrofia do musculo esquelético

mediados pelo treinamento físico: estudos de via de sinalização. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v. 7, n. 1, 2008.

FIELD, R. A. Ash and calcium as measures of bone in meat and bone mixtures. **Meat Science**, v. 55, n. 3, p. 255-264, 2000.

FOOTE, M. R.; HORST, R. L.; HUFF-LONERGAN, E. J.; TRENKLE, A. H.; PARRISH JR, F. C.; BEITZ, D. C. The use of vitamin D<sub>3</sub> and its metabolites to improve beef tenderness. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 242-249, 2004.

FRITTS, C. A. & WALDROUP, P. W. Effect of Source and Level of Vitamin D on Live Performance and Bone Development in Growing Broilers. **Poultry Science Association**, 12:45-52, 2003.

GALVÃO, L.O.; GALVÃO, M. F.; REIS, C. M. S.; BATISTA, C. M.; CASULARI, E. L. A. Considerações atuais sobre a vitamina D. **Brasília Médica**, v. 50, p. 324-332, 2013.

GARCIA, A. F. Q. M.; MURAKAMI, A. E.; DUARTE, C. R. A.; ROJAS, I. C. O.; PICOLI, K. P.; PUZOTTI, M. M. Use of vitamin D<sub>3</sub> and its metabolites in broiler chicken feed on performance, bone parameters and meat quality. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 26, p. 408-415, 2013.

GIJSBERS, R.; CEULEMANS, H.; STALMANS, W.; MATHIEU, B. Structural and catalytic similarities nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterases and alkaline phosphatases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 1361-1368, 2001.

GUYTON, A.C. **Tratado de fisiologia médica**. 11<sup>o</sup> Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1014p, 1997.

HAN, J. C.; CHEN, G.; WANG, J.; ZHANG, J.; QU, H. X.; ZHANG, C.; YAN, Y.; CHENG, Y. H. Evaluation of relative bioavailability of 25-hydroxycholecalciferol to cholecalciferol for broiler chickens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 29, p. 1145-1151, 2016.

HESS, J. B.; BILGILI, S. F. Carcass yield response of small broilers to feed nutrient density. In: XXII World Poultry Congress Istanbul, 2004, Turkey. **Anais...** Turkey, 2004. p. 8-13.

HOLICK, M.F. Vitamin D deficiency. **The New England Journal of Medicine**. p.357:266-81, 2007.

HUTTON, K. C.; VAUGHN, M. A.; LITTA, G.; TURNER, B. J.; STARKEY, J. D. Effect of vitamin D status improvement with 25-hydroxycholecalciferol on skeletal muscle growth characteristics and satellite cell activity in broiler chickens. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 3291-3299, 2014.

JOINER, K. S.; HAMLIN, G. A.; LIEN, R. J.; BILGILI, S. F. Evaluation of capillary and myofiber density in the pectoralis major muscles of rapidly growing, high-yield broiler chickens during increased heat stress. **Avian diseases**, n. 58, v. 3, p. 377-382, 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 556, 2013.

KESTIN, S. C.; KNOWLES, T. G.; TINCH, A. E.; GREGORY, N. G. Prevalence of leg weakness in broiler chickens and its relationship with genotype. **Veterinary Record**, v. 131, p. 190-194, 1992.

KORELESKI, J.; SWIATKIEWICZ, S. Efficacy of different limestone particle size and 25-hydroxycholecalciferol in broiler diets. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 14, p. 705-714, 2005.

KUTTAPAN, V. A.; LEE, Y. S.; ERF, G. F.; MEULLENET, J. F.; MCKEE, S. R.; OWENS, C. M. Consumer acceptance of visual appearance of broiler breast meat with varying degrees of White Striping. **Poultry Science**, v. 91, p.1240-1247, 2012.

LANTERI, P.; COLOMBINI, A.; BANFI, G. Vitamin D in exercise: physiologic and analytical concerns. **Clinica Chimica Acta**, v. 415, p. 45-53, 2013.

LAWRENCE, T. L. J.; FOWLER, V. R. Growth of farm animals. **CAB International**: New York, p. 26-101, 1997.

LONG, F.; ORNITZ, D. M. Development of the endochondral skeleton. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, p. 1, 2013.

LOPES, L. S. Aspectos fisiológicos e estruturais que influenciam o desenvolvimento do tecido muscular. **PUBVET**, v. 4, n. 18, 2010.

MCDOWELL; LEE RUSSELL. **Vitamin in Animal Nutrition**, Academic Press, 1989.

MCKEE, S.; BAUERMEISTER, L.; MOREY, A.; MORAN, E.; SINGH, M.; OWENS, C. Occurrence of White Stripping in Broiler Breast Fillets in Relation to Broiler Size. In: Proceedings of the XIII European Poultry Conference [CD-ROMs], Tours, France. **French Branch of World's Poultry Science Associations**: Tours, France, 2010.

MELLO, R. G. B.; SCHNEIDER, R. H.; COLLARES, F. M.; DALACORTE, M. M. Vitamina D e prevenção de queda em idosos. **Scientia Medica**, v. 20, n. 2, p. 200-206, 2010.

MENDES, A. A. Rendimento e qualidade da carcaça de frangos de corte. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2001; Campinas, São Paulo. **Anais...** Campinas, 2001. p.79-99.

MENDONÇA JÚNIOR, C. X. Enfermidades do Sistema Locomotor. In: BERCHIERI JÚNIOR, A; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 29-36.

MORAN, E. T. Effect of nutrition and feed additives on meat quality. In: XV European Symposium on the Quality of Poultry Meat, 2001, Kusudasi. **Anais...** Kusudasi, 2001. p. 99–107.



MURAKAMI, A. E. Balanço eletrolítico da dieta e sua influência sobre o desenvolvimento dos ossos de frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2000. **Anais...**, 2000. p. 33-61.

PERRY, R. W.; ROWLAND, G. N.; FOUTZ, T. L., GLISSON, J. R. Poultry malabsorption syndrome. III. Skeletal lesions in market age turkeys. **Avian Diseases**, v. 35, n. 4, p. 707–713, 1991.

MUTRYN, M. F. et al. Characterization of a novel chicken muscle disorder through differential gene expression and pathway analysis using RNA-sequencing. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1-19, 2015.

McDowell, Lee Russell - **Vitamins in Animal and Human Nutrition**; 2ª Edição – 2000.

PHADNIS, R; NEMERE, I. Direct, Rapid Effects of 25-Hydroxyvitamin D3 on Isolated Intestinal Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.90, p.287–293, 2003.

PETRACCI, M.; MUDALAL, S.; BABINI, E.; CAVANI, C. Effect of white striping on chemical composition and nutritional value of chicken breast meat. **Italian Journal of Animal Science**, v. 13, p. 3138, 2014.

PIZAURO JR, J. M. Estrutura e função do tecido ósseo. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. p.247-265.

PIZAURO JÚNIOR, J. M.; CIANCAGLINI, P.; MACARI, M. Discondroplasia tibial: mecanismos de lesão e controle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4; p. 169-185, 2002.

PIZAURO-JUNIOR, J. M.; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M. Estrutura e função do tecido ósseo. IN: MACARI, M.; MAIORKA, A. **Fisiologia das aves comerciais**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2017. p.492-511.

PONSO, R.; FARIA, D. E.; ALBUQUERQUE, R.; PAZ, I. C. L. A.; ARTONI, S. M. B.; SANTOS, A. L.; SAVIANI, G.; ARAUJO, C. M. M. Avaliação do desenvolvimento da discondroplasia tibial em frangos de corte submetidos à dieta com 25 hidroxicolecalciferol. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, p. 153-161, 2012.

PRICE, J. S.; RUSSEL, S. G. Bone remodeling: regulation by systemic and local factors. In: WHITEHEAD, C. C. **Bone biology and skeletal disorders in poultry**. Poultry Science Symposium 23. Carfax Publishing Co., 1992. p.38-60.

RATH, N. C.; BALOG, J. M.; HUFF, W. E. Comparative differences in the composition and biomechanical properties of tibiae of seven- and seventy-two week-old male and female broiler breeder chickens. **Poultry Science**, v. 78, n. 8 p. 1232–1239, 1999.

RATH, N. C.; HUFF, G. R.; BALOG, J. M. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. **Poultry Science**, v. 79, n. 7, p. 1024-1032, 2000.



SAKKAS, P.; SMITH, S.; HILL, T. R.; KYRIAZAKIS, I. A reassessment of the vitamin D requirements of modern broiler genotypes. **Poultry Science**, v. 0, p. 1-11, 2018.

SANDERCOCK, D. A., BARKER, Z. E., MITCHELL, M. A., HOCKING, P. M. Changes in muscle cell cation regulation and meat quality traits are associated with genetic selection for high body weight and meat yield in broiler chickens. **Genetics Selection Evolution**, v. 41, n. 1, 2009.

SANTOS, T. S. **Efeito de fitases de origem bacteriana no desempenho e qualidade óssea de frangos de corte**. 86 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

SIHVO, H. K., IMMONEN, K., PUOLANNE, E. Myodegeneration with fibrosis and regeneration in the pectoralis major muscle of broilers. **Veterinary Pathology**, v. 51, p. 619-623, 2014.

SILVA, M. D. P.; CARVALHO, R. F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, 2007.

SILVA, P. Z.; SCHNEIDER, R. H. O papel da vitamina D na força muscular em idosos. **Acta Fisiátrica**, v. 23, n. 2, p. 96-101, 2016.

SITRIN, M.D.; POLLACK, K.L.; BOLT, M.J.; ROSENBERG, I.H. Comparison of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D absorption in the rat. **American Journal of Physiology**. 1982.

SMITH, D. P.; LYON, C. E.; LYON, B. G. The effect of age, dietary carbohydrate source, and feed withdrawal on broiler breast fillet color. **Poultry Science**, n. 81, p. 1584–1588, 2002.

SOARES JUNIOR, J. H.; KERR, J. M.; GRAY, R. W. 25-Hydroxycholecalciferol in poultry Nutrition. **Poultry Science**, v. 74, p. 1919-1934, 1995.

SOUZA, D. K.; OLIVEIRA, J.R.; RODRIGUES, H.; COTA, N. B.; CARVALHO, M. M.; PRESTES, J.; DURIGAN, J. L. Q.; PEREIRA, E. C L. Regulação e ativação das células satélites durante a regeneração muscular. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, n. 23, v. 3, p. 170-180, 2015.

SWATLAND, H. J. Progress in understanding the paleness of meat with a low pH. **S Afr J Anim Sci**, v. 34, p. 1–7, 2004.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 488p, 1996.

TEEGARDEN, D.; MERIDETH, S. C.; SITRIN, M. Isolation and characterization of a 25-hydroxyvitamin binding protein from rat enterocyte cytosol. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 8, p. 195-200, 1997.

TURNER, C. H.; BURR, D. B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. **Bone**, v.14, n.4, p. 595-608, 1993.

VELLEMAN, S. G. Relationship of skeletal muscle development and growth to breast muscle myopathies: a review. **Avian Diseases**, v. 59, n. 4, p. 525-531, 2015.

VIEITES, F. M.; NALON, R. P.; SANTOS, A. L.; BRANCO, P. A. C.; SOUZA, C. S.; NUNES, R. B.; CALDERANO, A. A.; ARRUDA, N. V. M. Desempenho, rendimento de carcaça e cortes nobres de frangos de corte alimentados com rações suplementadas com *Solanum glaucophyllum*. **Semina Ciências Agrárias**, v. 35, p. 1617-1626, 2014.

VIGNALE, K.; GREENE, E. S.; CALDAS, J. V.; ENGLAND, J. A.; BOONSINCHAI, N.; SODSEE, P.; POLLOCK, E. D.; DRIDI, S.; COON, C. N. 25-Hydroxycholecalciferol Enhances Male Broiler Breast Meat Yield through the mTOR Pathway. **The Journal of Nutrition**, v. 145, p. 855–863, 2015.

VISSER, M.; DEEG, D. J.; LIPS, P. Low vitamin D and high parathyroid hormone levels as determinants of loss of muscle strength and muscle mass (*sarcopenia*): the Longitudinal Aging Study Amsterdam. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, p. 5766-72, 2003.

WARD, N.E. Consideration of vitamin D3 absorption may be needed. **Feedstuffs**. Minnetonka. v.76,n.4,p.827-836, 2004.

WHITEHEAD, C. The black boné syndrome in broilers. **International Hatchery Practice**, v. 23, n. 8, p. 7-9, 2009.

WIDEMAN, R. F.; BLANKENSHIP, J.; PEVZNER, I. Y.; TURNER, B. J. Efficacy of 25-OH vitamin D3 prophylactic administration for reducing lameness in broilers grown on wire flooring. **Poultry Science**, v. 94, p. 1821-1827, 2015.

YARGER, J. G.; SAUNDERS, C. A.; MCNAUGHTON, J. L.; QUARLES, C. L.; HOLLIS, B. W.; GRAY, R. Comparison of dietary 25-hydroxycholecalciferol and cholecalciferol in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 74, p.1159-1167, 1995.

ZEOLA, N.M.B.L.; SILVA SOBRINHO, A.G.; BORBA, H.; MANZI, G.M.; NONATO, A.; ALMEIDA, F.A. Avaliação do modelo de produção e da inclusão de gordura nos parâmetros qualitativos e sensoriais do hambúrguer ovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.3, p.727-734, 2012.